

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Polyelektrolytbeschichtung von Mikrokapseln (PEMC)-  
Adsorption und Aktivität von Trypsin

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Eike Garbers  
aus Ulm

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. H. Bäuml

2. Prof. Dr. med. G. Brezesinski

3. Prof. Dr. B. Neu

Datum der Promotion: 23.06.2006

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
2.1	POLYELEKTROLYTMIKROKAPSELN .....	7
2.1.1	<i>Herstellung von PEMC mittels Layer-by-Layer-Technologie .....</i>	<i>9</i>
2.1.2	<i>Template für PEMC .....</i>	<i>10</i>
2.1.3	<i>Membraneigenschaften und Polyelektrolytbeschichtung von PEMC.....</i>	<i>12</i>
2.2	ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN .....	13
2.3	TRYPSIN .....	16
2.4	AUFGABENSTELLUNG .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
3.1	BIOLOGISCHE UND CHEMISCHE MATERIALIEN .....	19
3.1.1	<i>Erythrozyten .....</i>	<i>19</i>
3.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>19</i>
3.1.3	<i>Lösungen.....</i>	<i>20</i>
3.2	HERSTELLUNG DER POLYELEKTROLYTMIKROKAPSELN .....	22
3.2.1	<i>Fixierung, Polyelektrolytbeschichtung und Auflösung des Kerns .....</i>	<i>22</i>
3.2.2	<i>Polyelektrolytbeschichtung fixierter Erythrozyten .....</i>	<i>22</i>
3.2.3	<i>Weiterbeschichtung der Polyelektrolytmikrokapseln .....</i>	<i>24</i>
3.3	METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER POLYELEKTROLYTMIKROKAPSELN ..	25
3.3.1	<i>Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) .....</i>	<i>25</i>
3.3.2	<i>Zellelektrophorese .....</i>	<i>27</i>
3.3.3	<i>Durchflusszytometrie (FACS) .....</i>	<i>29</i>
3.3.4	<i>Photometrische Messungen .....</i>	<i>31</i>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
4.1	UNTERSUCHUNG DER TRYPSINKONZENTRATION IN ÜBERSTÄNDEN DER WASCHZYKLEN.....	34
4.2	EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER POLYANIONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT .....	35
4.2.1	<i>PSS.....</i>	<i>35</i>
4.2.2	<i>Alginat .....</i>	<i>36</i>
4.2.3	<i>Dextranulphat .....</i>	<i>37</i>
4.3	UNTERSUCHUNGEN MITTELS CLSM .....	37
4.4	VERFOLGEN DES SCHICHTAUFBAUS MITTELS ZELLELEKTROPHORESE .....	40
4.4.1	<i>Zellelektrophoretische Mobilität der PEMC bei Beschichtung mit PSS und Trypsin.....</i>	<i>40</i>
4.4.2	<i>Zellelektrophoretische Mobilität bei Beschichtung mit Alginat und Trypsin....</i>	<i>42</i>
4.5	MESSUNG DER FLUORESZENZINTENSITÄT MIT DEM FLOWZYTOMETER .....	42
4.5.1	<i>Fluoreszenzintensität bei Beschichtung mit PSS und FITC-Trypsin.....</i>	<i>43</i>
4.5.2	<i>Fluoreszenzintensität bei Beschichtung mit Alginat und FITC-Trypsin .....</i>	<i>44</i>
4.6	ERGEBNISSE PHOTOMETRISCHER MESSUNGEN .....	46
4.6.1	<i>Menge gebundenen Trypsins pro PEMC .....</i>	<i>46</i>
4.6.2	<i>Aktivität pro Kapsel.....</i>	<i>49</i>
4.6.3	<i>Aktivität des immobilisierten Enzyms bezogen auf die gemessene Enzymkonzentration .....</i>	<i>50</i>
4.6.4	<i>Vergleich der Aktivitäten von an PEMC immobilisiertem und freiem Enzym .....</i>	<i>51</i>
4.6.5	<i>Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität des freien und</i>	

<i>immobilisierten Enzyms</i> .....	53
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>56</b>
5.1 LAYER-BY-LAYER ADSORPTION VON TRYPSIN .....	56
5.2 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER POLYANIONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT .....	57
5.3 UNTERSUCHUNG DER OBERFLÄCHENLADUNGEN BEI DER LAYER-BY-LAYER BESCHICHTUNG .....	59
5.4 UNTERSUCHUNGEN MITTELS CLSM .....	60
5.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE (FACS) UNTERSUCHUNGEN ZUR LAYER-BY-LAYER BESCHICHTUNG DER POLYELEKTROLYTMIKROKAPSELN..	61
5.6 PHOTOMETRISCHE MESSUNGEN .....	63
5.6.1 <i>Menge gebundenen Trypsins pro PEMC</i> .....	63
5.6.2 <i>Aktivität des immobilisierten Trypsins pro einzelner PEMC</i> .....	65
5.7 KORRELATION ZWISCHEN FLOWZYTOMETRISCHEN UND PHOTOMETRISCHEN MESSUNGEN.....	67
5.8 DISKUSSION DER VERGLEICHENDEN VERSUCHE ZUM EINFLUSS DES PH-WERTES AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT VON FREIEM UND IMMOBILISIERTEM TRYPSIN .....	74
<b>6 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN</b> .....	<b>76</b>
<b>7 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</b> .....	<b>77</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
<b>9 DANKSAGUNG</b> .....	<b>86</b>
<b>10 ERKLÄRUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>11 LEBENS LAUF</b> .....	<b>88</b>

## 1 Zusammenfassung

Künstliche Zellen stellen nicht nur Modellobjekte zur Untersuchung der in biologischen Objekten ablaufenden Prozesse dar, sie können auch Funktionen von Zellen im Organismus übernehmen. Polyelektrolytmikrokapseln (PEMC) stellen ein neuartiges System für dieses Vorhaben dar. Durch Einbringen von z.B. Hämoglobin in solche PEMC können sie als künstliche Erythrozyten den Gas-transport im Organismus unterstützen bzw. übernehmen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass jede Zelle des Säugetierorganismus zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion Enzyme benötigt, die ihre Stoffwechselfunktionen katalysieren. Auch Erythrozyten verwenden zur Oxigenierung des Hämoglobins eine Reihe von unterschiedlichen Enzymen. Um sich der Lösung dieses Problems bei der Entwicklung eines künstlichen Erythrozyten schrittweise zu nähern, wurde als Modell-enzym Trypsin ausgewählt. Sein Molekulargewicht und sein isoelektrischer Punkt liegen im Bereich vieler anderer in Frage kommender Enzyme. Außerdem bietet Trypsin den Vorteil, bezüglich seiner Konzentration und seiner Aktivität leicht quantifizierbar zu sein, womit gute Voraussetzungen für die Untersuchung grundlegender Fragen gegeben sind.

Es wurden Polyelektrolytmikrokapseln (PEMC) auf der Basis von Erythrozyten durch Selbstassemblierung von Polynatriumstyrenesuphonat (PSS) und Polyallylamino-hydrochlorid (PAH) hergestellt  $((PSS/PAH)^2PSS)$ , und anschließend nach der Layer-by-Layer Methode (LbL) alternierend mit Trypsin und den Polyelektrolyten (PE) PSS, Alginat oder Dextranulphat weiterbeschichtet. Der Schichtenaufbau wurde durch Zellelektrophorese, konfokale Laserscanning-mikroskopie (CLSM), Durchflusszytometrie (FACS) und photometrische Proteinbestimmung charakterisiert und quantifiziert. Die Aktivität des an der PEMC-Membran immobilisierten Enzyms wurde untersucht und mit der Aktivität freien Trypsins verglichen. Weiterhin wurden pH-Profile von freiem Enzym mit denen des immobilisierten Trypsins verglichen.

Der Schichtaufbau aus Trypsin und den unterschiedlichen Polyelektrolyten wurde anhand der Änderung der elektrophoretischen Mobilität beim Aufbringen jeder Schicht, sowie durch die Zunahme der photometrisch bestimmten Proteinmenge pro PEMC charakterisiert. Außerdem wurde Trypsin mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markiert und in den Beschichtungsserien die Zunahme der

flowzytometrisch bestimmten Fluoreszenz-Intensität mit jeder aufgetragenen FITC-Trypsin Schicht beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die auf eine Trypsin-Schicht folgende PE-Schicht diese nicht desorbieren lässt. Der Schichtenaufbau zeigt ein charakteristisches Wachstum. Die ersten drei bis vier Schichten zeigen einen geringeren Zuwachs, erst danach stellt sich lineares Schichtenwachstum ein. Die Aktivität des an den PEMC immobilisierten Trypsins beträgt etwa 30% der Aktivität freien Trypsins gleicher Konzentration. Überdies zeigt sich eine Verschiebung des pH-Optimums des Enzyms um 0,5 Einheiten in basische Richtung.

Um der verminderten Aktivität des immobilisierten Trypsins auf den Grund zu gehen, werden die erschwerte Diffusion des Substrates zum Enzym durch die netzartige Struktur der PE- Membran und eine direkte Hemmung des Trypsins durch PSS untersucht und diskutiert. Ebenso die elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der PEMC-Membran, die die Aktivität des Enzyms vermutlich mindern. Selbst bei hoher Schichtenanzahl scheinen auch tief liegende Enzymschichten an der Umsetzung des chromogenen Substrates beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass sich Trypsin im Rahmen eines Schichtaufbaus nach der LbL-Technologie in die Membran der verwendeten PEMC einbringen lässt. Dabei behält das Enzym einen Teil seiner Funktion. Dieses Ergebnis bietet die Grundlage für weiterführende Experimente zum Einbringen überlebensnotwendiger Enzyme in die Membran künstlicher Zellen. Zusätzlich erschließen sich damit eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten für mikroskopisch große Kapseln mit einer komponierbaren Enzymhülle.

## **2 Einleitung**

Die Einkapselung von Materialien ist ein weit verbreitetes Prinzip in der Natur, das der Mensch schon früh beobachtet und in nützliche Technik umgewandelt hat. An erster Stelle der Anwendungen mag wohl die Lagerung und den Transport des lebensnotwendigen Trinkwassers gestanden haben. Damit vergrößerte der Mensch seinen Bewegungsradius, weil er weniger abhängig von einem permanenten Trinkwasserangebot der Natur wurde. In Übertragung auf andere Arten von Stoffen wurde das Prinzip der Einkapselung wohl insofern auch als eine Konservierungsmethode angewendet, als die Stoffe gegen ihre -meist oxidativen- Umweltbedingungen abgeschlossen und damit haltbarer wurden.

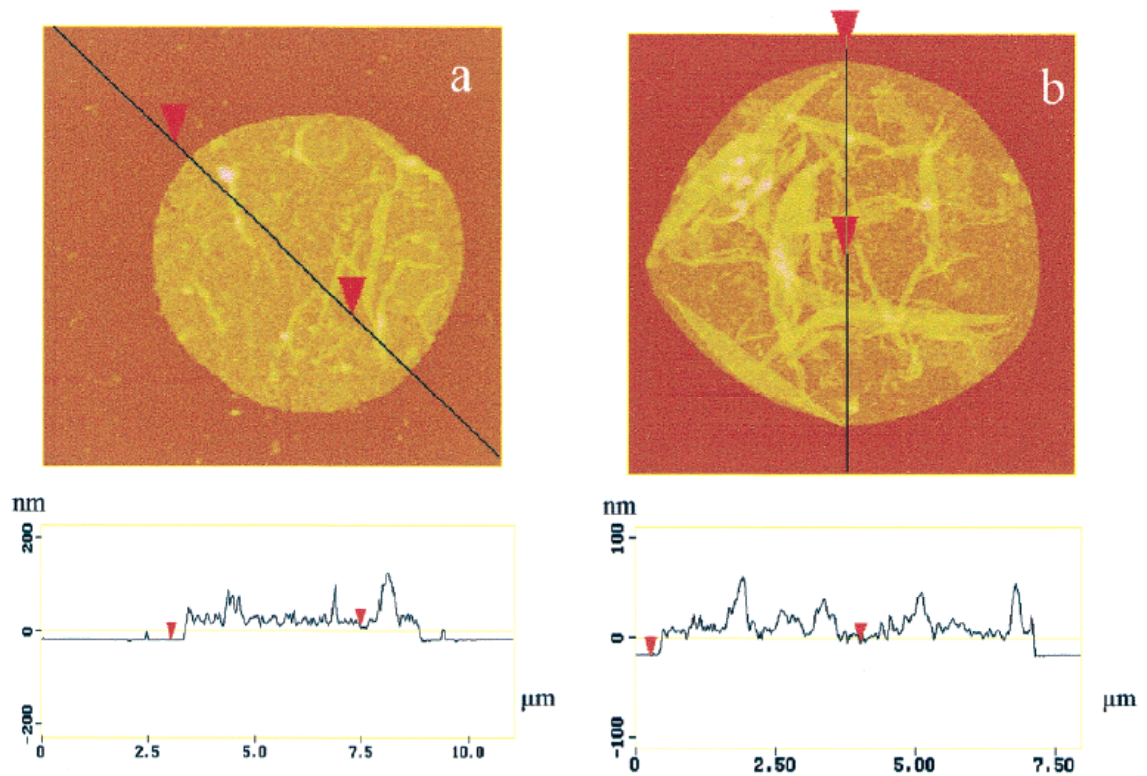
Das Prinzip der Einkapselung findet sich nicht nur in dem beschriebenen makroskopischen Maßstab, sondern erstreckt sich vom Universum bis in kleinste mikro- oder nanoskopische Skalierungen. Man kann die Erdatmosphäre ebenso wie die kleinen Membranen der Zellorganellen als eine Kapsel bezeichnen, die ihren Reaktionsraum gegen die umgebenden Bedingungen abgrenzen und dadurch unser Leben überhaupt erst ermöglichen. Jedes elektrische Potential ist letztlich abhängig von einer Membran, deren Permeabilitätseigenschaften diese Reaktionen steuern. So z.B. die Atmungskette, die den Organismus mit Energie in Form von ATP versorgt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und Funktion von Mikrokapseln, die aus Polyelektrolyten hergestellt werden.

### **2.1 Polyelektrolytmikrokapseln**

Als Polyelektrolytmikrokapseln (PEMC) werden dreidimensionale Körper bezeichnet, die durch sukzessive Adsorption entgegengesetzt geladener Polyelektrolytschichten auf einen Matrizenkörper aufgebaut sind. Dieser wird nach der Beschichtung heraus- bzw. aufgelöst und es entsteht eine leere Polyelektrolythülle (s. Abb. 1). Diese Polyelektrolythülle hat je nach Präparation und Polyelektrolytzusammensetzung sehr unterschiedliche Eigenschaften. Besonderes Interesse gilt der Steuerung der Permeabilität für unterschiedliche Substrate [35, 77, 94] und der Modifizierung der Membranelastizität [7, 37]. Damit können Mikrocontainer

erzeugt werden, deren Inhalt kontrolliert freigesetzt werden könnte [3, 70, 79, 85]. Ein weiteres Ziel aktueller Forschung besteht darin, die Biokompatibilität der Kapselbestandteile zu verbessern und damit die Möglichkeit der medizinischen Anwendbarkeit zu erweitern. So könnten PEMC unterschiedlichster Art, z.B. mit Hämoglobin beladen als künstliche Sauerstoffträger, dem Menschen injiziert werden und in der Blutbahn zirkulieren [Bäumler et al. 2005].



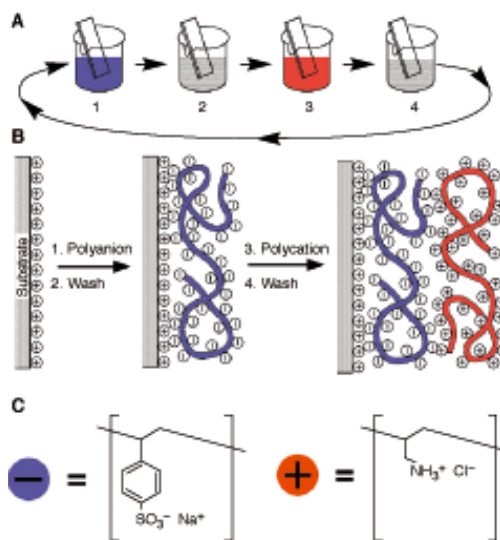
**Abb. 1: SFM-Aufnahme von Luftgetrockneten Polyelektrolytmikrokapseln** bestehend aus fünf Schichten  $((\text{PSS}/\text{PAH})_2\text{PSS})$  (a) bzw.  $(\text{DxSO}_4/\text{PAH})_2\text{DxSO}_4$ . Unten sind die Höhenprofile der entsprechenden Kapseln dargestellt [35].

Polyelektrolytmikrokapseln (PEMC) haben eine etwa dreißigjährige Geschichte [14, 22]. Ihre Größe ist abhängig von der Größe des verwendeten Templates und kann zwischen 100 nm und 10 μm variieren [25, 66]. In der Literatur wird eine Vielzahl unterschiedlicher Mikrokapseln beschrieben, die sich im Wesentlichen durch ihre Schichtenanzahl, Polyelektrolytzusammensetzung, ihre Matrizen und die gegebenenfalls in die Polyelektrolytschichten eingebrachten Substanzen unterscheiden.



### 2.1.1 Herstellung von PEMC mittels Layer-by-Layer-Technologie

Die Herstellung dreidimensionaler Mikroapseln durch Polyelektrolyt Selbstassemblierung wird durch die alternierende Adsorption entgegengesetzt geladener Polyelektrolytschichten an ein formgebendes Templat möglich [14, 22, 85]. In Abb. 2 ist diese 14 Jahre alte Layer-by-Layer-Technologie (LbL) schematisch dargestellt. Der sukzessive Aufbau von Multischichten prinzipiell unbegrenzter Anzahl beruht auf elektrostatischer Anziehung und Komplexbildung von Polyanionen und Polykationen. Die Dicke einer solchen Polyelektrolytschicht beträgt etwa 16,6 Å [29]. Als formgebende Matrize können grundsätzlich alle geladenen Strukturen beliebiger Form und Größe verwendet werden. Entscheidend sind die ausreichende Oberflächenladung der Matrize und ein Überschuss der Polyelektrolyte, um einen kontrollierten Schichtaufbau zu ermöglichen. Die Ladung der Templatoberfläche sowie der Polyelektrolyte kann gegebenenfalls durch geschickte Wahl des pH-Wertes während der Beschichtung beeinflusst werden.



**Abb. 2: Schema des Vorgehens zur Layer-by-Layer-Technologie zum Aufbau von Polyelektrolytschichten auf geladene Oberflächen.** A) Geladene Substrate werden abwechselnd in Polyelektrolytlösungen getaucht. Die Schritte 1 und 3 stellen die Adsorption eines Polyanions bzw. Polykations dar. Schritte 2 und 4 sind Waschschrte. B) schematische molekulare Darstellung der ersten beiden Adsorptionsschritte. C) Chemische Struktur zweier typischer Polyelektrolytmoleküle Poly(natriumstyrenulfonat) (PSS) und Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) [22].

Zur Herstellung hohler Mikroapseln muss sich der Matrizenkörper restlos auflösen lassen, ohne dabei die Polyelektrolytschichten zu zerstören [22, 62, 66].

Durch die alternierende Adsorption der verschiedenen Polyelektrolyte kommt es zu einer Überkompensation der Ladung der vorhergehenden Schicht (s. Abb. 2). Das bedeutet, dass die Anzahl der Ladungen, die auf der PEMC-Membran

lokalisiert sind, zu einem Großteil durch die Polyelektrolytmoleküle belegt werden, wobei die PE-Moleküle aufgrund ihrer räumlichen Struktur jedoch nach außen mehr Ladungen präsentieren, als sie an der Membran belegen. So ist der Betrag der Oberflächenladung nach Aufbringen dieser Schicht größer als vorher, wobei sich natürlich das Vorzeichen dieser Ladung geändert hat. Durch den Effekt der Überkompensation ist es möglich, die Ladungsunterschiede zwischen Matrize und Polyelektrolyten im Laufe vieler Beschichtungen aufrecht zu erhalten und sogar zu vergrößern [72]. Gegenionen in den Polyelektrolytschichten werden in großer Zahl freigesetzt, was zu einem großen Entropiegewinn im System führt, der letztlich die treibende Kraft bei der Anlagerung der Schichten ist. Im Gegensatz zu kleineren Molekülen sind die Polymere überdies in der Lage, Mikrodefekte der Membran zu überbrücken [22].

### 2.1.2 Template für PEMC

Ursprünglich wurden Polyelektrolytschichten mittels LbL-Technologie auf ebene Substratflächen wie Silizium oder Glas aufgebracht [13, 60]. Erst später wurde diese Technologie erweitert, um unterschiedliche Substrate zu beschichten. So können etwa Melaminformaldehydpartikel beschichtet werden. Diese Partikel lösen sich in wässrigen Lösungen bei einem pH-Wert  $< 1,6$  in Monomere auf, die durch die Kapselwand permeieren [24, 25]. Die resultierenden PEMC enthalten allerdings verbleibende MF-Oligomere, die zunächst die Biokompatibilität dieser Partikel in Frage stellen lassen. Ein weiterer Nachteil der verbleibenden MF-Oligomere besteht darin, dass sie osmotisch wirksam sind. Dadurch lassen sie die PEMC bei Änderung der Osmolarität der umgebenden Lösung schwellen und schrumpfen [27, 31, 32]. Diese Eigenschaft ermöglicht eine einfache Beladung des Innenraumes dieser PEMC, da sich beim Schwellen der Kapseln die Permeabilität stark erhöht und die geschrumpften Kapseln eine sehr geringe Permeabilität zeigen. Die Auflösung der MF-Partikel verursacht Löcher unterschiedlicher Größe in der Kapselwand, wodurch die Permeabilität nicht exakt gesteuert werden und die Kapsel insofern auch nicht als geschlossen betrachtet werden kann. Eine Alternative besteht in der Verwendung von  $\text{CaCO}_3$  Partikeln, die in unterschiedlichen Größen zur Verfügung stehen. Diese lassen sich z.B. mit Proteinen inkubieren und anschließend mittels LbL-Technologie beschichten. Die

Partikel können schonend aufgelöst werden, ohne dass es zu einer erheblichen Schädigung des Proteins kommt. Dieses zeigen Volodkin et al. am Beispiel von Lactalbumin und Peroxidase (HRP) [92]. Ein Vorteil dieser  $\text{CaCO}_3$  Partikel ist die gute Biokompatibilität des Salzes.

Auch biologische Zellen dienen als Template für die Polyelektrolytbeschichtung [62]. Es ist bisher gelungen, das Bakterium *Escherichia Coli* und Erythrozyten unterschiedlicher Spezies mit einer stabilen Polyelektrolythülle sowohl aus Poly(natriumstyrensulfonat) (PSS) als auch aus Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) zu umgeben. Experimente zur Abschirmung von Oberflächenantigenen lebender Zellen haben zum Ziel, eine Transplantation unter Verzicht von Immunsuppression zu ermöglichen [73, 74]. So wurden pancreatische Inselzellen mit erhaltener Insulinsekretion verkapselt [19, 73]. Auch striatale Neurone der Substantia Nigra, deren Verlust den M. Parkinson auslöst, wurden erfolgreich in vitro verkapselt und zeigten eine über Monate erhaltene Dopaminsekretion [91]. Menschliche Knorpelzellen waren in vitro in der Lage, nach einer Immobilisation Knorpelgrundsubstanz zu synthetisieren [39]. Mai et al. gelang es sogar, immortalisierte, cryopreservierte und mit einer Mikroverkapselung versehene xenogene Hepatocyten unter Verzicht einer Immunsuppression intraperitoneal bei Ratten mit fulminantem Leberversagen zu transplantieren. Das Überleben der Tiere konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant zu erhöht werden [54].

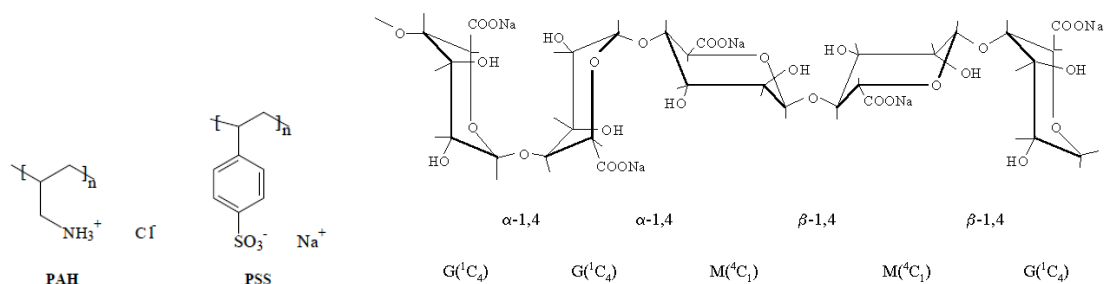
Weitere experimentelle Bemühungen untersuchten den protektiven Effekt der Membran gegen aggressive Magensäure [11, 49]. Zum Schutz gegen gastrointestinale Proteasen wurden Enzymkristalle (Katalase) mit Polyelektrolythüllen beschichtet [55]. Um eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung zu erreichen, wurden Ibuprofen-Mikropartikel eingekapselt [68] und polykathionische Aminoglycosid-Antibiotika in die Membran von PEMC mittels Layer-by-Layer Technik eingebracht [45]. Weiterhin wurden auch kristalline Formen von Vitaminen und Insulin mit Polyelektrolytschichten umgeben, um ihre Freisetzung zu steuern [21].

Biologische Matrizen verfügen in der Regel über eine gute Oberflächenladungsdichte und eignen sich dadurch gut für die Beschichtung. Ein besonderes Interesse gilt dabei der Verwendung von Erythrozyten als Template für PEMC. Da die Formstabilität der nativen Erythrozyten zu gering ist, um eine gute Beschichtung zu erlauben, müssen diese vor der Beschichtung mit niedermolekularen

Aldehyden, meist Glutaraldehyd, fixiert werden. Dabei werden die Membranproteine vernetzt und hochstabile Partikel erzeugt [25, 62, 36]. Das Auflösen des Erythrozyten nach der Polyelektrolytbeschichtung erfolgt durch die oxidative Behandlung mit Natriumhypochlorid (Deproteinizer), wobei die zytoplasmatischen Bestandteile zu kleinen Molekülen degradiert werden, die den Polyelektrolytfilm durchdringen [62]. Diese oxidative Auflöseprozedur verändert allerdings die Eigenschaften der Polyelektrolythülle. So verliert die Hülle ihre positiven Ladungen und es kommt zu kovalenten Quervernetzungen der Polyelektrolytmoleküle [36, 57]. Weiterhin nimmt die Permeabilität der PEMC durch diese Prozedur stark zu. Durch Weiterbeschichtung dieser hohlen Kapseln mit Polyelektrolyten kann die Permeabilität allerdings wieder reduziert werden [36].

### 2.1.3 Membraneigenschaften und Polyelektrolytbeschichtung von PEMC

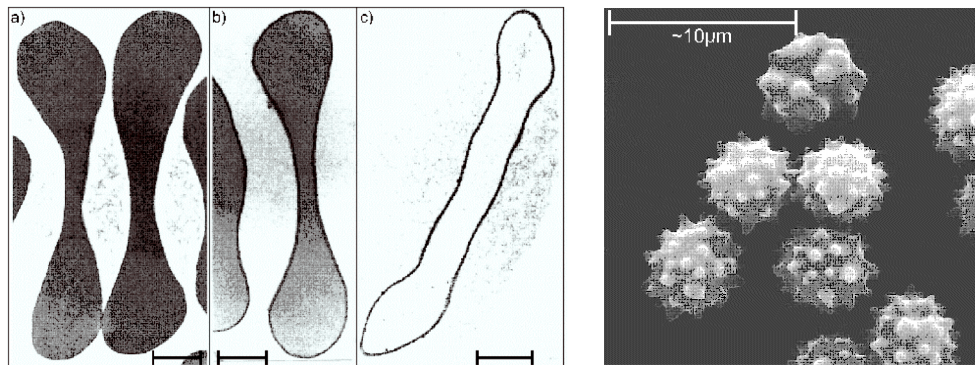
Gängige Polyelektrolytmoleküle sind auf anionischer Seite Poly(natriumstyrensulfonat) (PSS), Dextranulphat und Alginat, auf polykationischer Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH). Der Vorteil von Dextranulphat und Alginat ist im Gegensatz zu PSS die gute Biokompatibilität [64]. In der Abb. 3 sind die Strukturformeln einiger Polyelektrolytmoleküle angegeben.



**Abb. 3: Strukturformeln von Poly(natriumstyrensulfonat) (PSS), Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) und Alginat**

Die entstehenden PEMC sind ihren Templaten in Größe und Form sehr ähnlich und zeichnen sich durch Stabilität und Flexibilität aus. Werden zum Beispiel Erythrozyten mit zehn Polyelektrolytschichten PSS/PAH beschichtet, so bleibt die PEMC-Membran dicht auf der des Erythrozyten adsorbiert. Auch wenn dieser (bei

steigender Osmolarität) die Form eines Echinozyten annimmt, bleibt die Polyelektrolytschicht intakt (s. Abb. 4) [62].



**Abb. 4:** Links: transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen a) fixierter Erythrozyten, b) fixierter Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten und c) einer Polyelektrolythülle (10 Schichten) nach dem Zersetzen des Erythrozyten. Die Balken entsprechen jeweils 1 µm. Rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme fixierter Echinozyten mit 10 Polyelektrolytschichten (PAH/PSS) [62].

PEMC können nach Ihrer Herstellung und der Auflösung Ihres Kernes weiterbeschichtet werden. Das Vorgehen unterscheidet sich nicht von dem prinzipiellen Vorgehen bei Ihrer Herstellung. Durch die Weiterbeschichtung wird die Permeabilität der PE-Membran reduziert und eventuelle Läsionen oder Strukturstörungen, die aus dem Auflöseprozess resultieren, abgedeckt [7]. Da einige Kapseln nach Auflösen des Kernes eine hohe Permeabilität aufweisen, gelingt es, die Kapseln direkt nach Auflösen des Kernes per Diffusion mit Substanzen zu füllen, deren Austritt aus der Kapsel durch anschließende Weiterbeschichtung verhindert wird [7]. Durch die Weiterbeschichtung kann die Dicke der Membran nahezu beliebig variiert werden. Weiterhin kann während der Weiterbeschichtung eine große Vielzahl zusätzlicher Substanzen in die Membran eingebracht werden (s. 2.2).

## 2.2 Anwendungsmöglichkeiten

Die Einsatzmöglichkeiten von PEMC sind vielfältig. Besonders erwähnenswert sind die Methoden, die sich mit dem Einbringen von Proteinen, insbesondere von Enzymen, sowie von Nukleinsäuren, Lipiden und Metallen in die Polyelektrolytmembran oder in das Kapselinnere befassen.

Eine Reihe von Experimenten widmen sich der Immobilisierung von Proteinen [16] und Enzymen in oder an PEMC, wie zum Beispiel Urease [53], Glucose Oxidase

[90], Chymotrypsin [6, 87, 89], Insulin [21], Albumin und Hämoglobin [35, 47]. Peroxidase zum Beispiel wurde von G. Balabushevich et al. [5] erfolgreich in PEMC eingebracht, die aus dem PE-Paar Protamin / Dextranulphat auf Melamin-Formaldehyd-Partikel (MF) aufgebaut waren. Nach Auflösen der MF-Partikel wurde ein Schwellen der PEMC bei pH-Werten um 8 und ein Schrumpfen bei pH 5 beobachtet. Wurden die PEMC bei pH 8 mit Peroxidase (HRP) inkubiert und anschließend bei pH 4-5 gewaschen, konnte besonders viel Enzym im Kapselinneeren nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die PEMC-Membran bei großem pH-Wert eine höhere Permeabilität aufweist als bei kleinem und dass man auf diese Weise das Enzym „einfangen“ kann [31]. So wurde eine Aktivität des in den PEMC enthaltenen Enzyms von 57% beschrieben. Sehr ähnliche Ergebnisse erzielten Tiourina et al. bei der Immobilisierung von Chymotrypsin in MF-Partikeln mit einer Aktivität des immobilisierten Enzymes zwischen 30 und 60% im Vergleich zum nicht immobilisierten Enzym [87].

Ein grundsätzlich anderer Ansatz von F. Caruso beschreibt die PE-Beschichtung von Katalase-Biokristallen mit PSS und PAH. Bei diesem Vorgehen besteht das Templat gleichzeitig aus der einzukapselnden Substanz. Ein Auflösen des Templates und das Einbringen einer anderen Substanz entfällt bei diesem Vorgehen. Dabei werden besonders große Enzymmengen im Inneren der Kapsel eingeschlossen. Die Kapsel selbst dient in diesem Fall als Schutz des Enzyms vor Proteolyse oder Denaturierung durch saure Umgebungslösung. Auch in diesem Falle ist eine Permeabilitätsänderung bei Änderung des pH-Wertes beschrieben. Dieser Effekt könne ggf. genutzt werden, um eine kontrollierte Abgabe des Enzyms zu gewährleisten [16, 17]. Ein ähnlicher Ansatz beschreibt die Einkapselung von Trypsin in Ca-Alginat-Kapseln. In diesem Falle wird das Enzym vor der Beschichtung durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd präzipitiert. Das so vernetzte Enzym erhält seine Funktion dadurch, dass es anschließend mit dem Polyelektrolyten beschichtet wird. Jaturanpinyo beschreibt sogar eine Stabilisierung der tryptischen Aktivität über drei Wochen, während freies Enzym in dieser Zeit autolysierte [20, 43].

D. Shchukin et al. [77] beschreiben die PE-Einkapselung von DNA-Molekülen mit Chondroitinsulphat und Polyarginin. Ziel dieses Versuches sei es, das gentherapeutische Problem zu lösen und DNA in den Nucleolus zu transferieren, ohne

dass diese intrazellulär proteasomal abgebaut wird. Der proteasomale Abbau könne durch die inerten Eigenschaften der Polyelektrolytmembran verhindert werden.

Ein weiterer Ansatz von Radtchenko et al. [69] beschreibt die Präzipitatbildung hydrophober Pharmaka in PEMC und die prinzipielle Möglichkeit, damit die Löslichkeit z.B. im Blut plasmaproteinunabhängig zu verbessern. Khopade et al. gelang die Beschichtung von PEMC auf der Basis von Zinkoxidkolloiden mit Aminoglycosidantibiotika unter Verwendung von PSS und Dextranulphat als Polyelektrolytmoleküle [46].

O.P.Tiourina et al. [88] beschreiben sowohl den Aufbau von Membranpotentialen von bis zu -35mV an PSS/PAH-Kapseln, die mit Phospholipiden weiterbeschichtet wurden, als auch die Induktion eines Na/K-Transportes mit Gramacidin. H. Möhwald et al. haben einige Publikationen veröffentlicht, die sich mit einer Polyelektrolyt/Phospholipid-Beschichtung von PEMC beschäftigen [34, 35]. Ihr besonderes Interesse richtet sich dabei auf die Steuerbarkeit der Permeabilität dieser Kapseln.

Experimente unserer Arbeitsgruppe befassen sich unter anderem mit der Einkapselung von Biomakromolekülen. So ist es z.B. gelungen, humanes Serumalbumin (HSA) in PEMC zu immobilisieren. Die Permeabilität der PEMC-Membran wurde untersucht und ein signifikanter Anstieg bei steigender Ionenstärke der Umgebungslösung (über 1mM) festgestellt. Dieser Mechanismus lässt eine kontrollierte Proteinfreisetzung aus den PEMC zu [35]. Neben der Ionenstärke ist in vorliegenden Arbeiten ebenfalls dargelegt, dass sich auch der pH-Wert der Umgebungslösung eignet, die Permeabilität der Mikrokapseln zu steuern [23]. Weiterhin konnte Hämoglobin in PEMC aus biokompatiblen Polyelektrolyten immobilisiert werden. Das Ziel besteht darin, diese PEMC als potentielle künstliche Sauerstoffträger in der Blutzirkulation von Säugetieren einsetzen zu können. Andere Darstellungen nutzen die Phagozytose der PEMC, um etwa zytostatisch wirkende Medikamente in PEMC einzubringen, die dann von maligne entarteten Leukozyten phagozytiert werden sollen. So könnten bestimmte Formen der Leukämie gezielt chemotherapiert werden [70].

Weiterhin gelingt es, kleinste Eisenpartikel an PEMC zu binden, indem sie an der Membran immobilisiert werden oder durch lange Inkubation unter bestimmten

Voraussetzungen in das Kapselinnere transferiert werden [18, 51]. Die auf diese Weise entstehenden PEMC reagieren auf ein magnetisches Feld und eröffnen hoffnungsvolle Perspektiven für eine magnetische Medikamentenplatzierung im Körper bei einfacher periphervenöser Applikation. Eine mögliche Anwendung wäre die gezielte Platzierung von Chemotherapeutika im Bereich eines Tumors und damit die Verringerung der systemischen Nebenwirkungen [2].

Biotechnologische Experimente von Sukjorukov et al. beschäftigen sich mit PEMC, die durch Diffusion mit organischen Lösungen gefüllt werden. Nach Überführung in wässrige Lösungen bleiben diese stabil und stellen damit eine viel versprechende Perspektive für emulgatorfreie Öl/Wasser-Suspensionen dar [58].

### **2.3 Trypsin**

Trypsin ist eine Serinoprotease, die vorrangig im Pankreas von Säugetieren, aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe synthetisiert wird. So wurden unterschiedliche Proteasen in unterschiedlichen Säugetierorganismen beschrieben, die als Trypsin oder trypsinähnliche Proteasen zusammengefasst werden und sich in ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind [1, 4, 10, 65]. Es handelt sich um ein etwa 24kDa großes Protein, das aus einer Einzelkette mit 223 Aminosäureresten besteht. Die Endopeptidase Trypsin wird durch limitierte Proteolyse aus Trypsinogen synthetisiert, indem durch das Enzym Enteropeptidase ein N-terminales Hexapeptid abgespalten wird. Die Peptidkette ist durch 6 Disulfidbrücken gefaltet, das aktive Zentrum ist histidin- und serinreich. Die proteolytische Aktivität löst typischerweise C-Terminale Peptide an den basischen Lysin- oder Argininresten. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 7 und 9, der Isoelektrische Punkt (PI) liegt im Bereich von pH10,5. Die Aktivität von Trypsin wird stabilisiert durch die Anwesenheit von Kalziumionen, da sie die Substratbindung im aktiven Zentrum verbessern. Trypsin hydrolysiert neben Peptidbindungen auch Ester- und Amidbindungen [10, 80].

Trypsin wird durch Serinoproteasenhemmstoffe gehemmt. Am populärsten sind Aprotinin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und  $\alpha_1$ -Antitrypsin [11, 80]. Die photometrische Quantifizierung gelingt bei 280nm, da Trypsin dort, wie viele Proteine, ein Absorptionsmaximum besitzt [80]. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung gering



konzentrierten Trypsins in wässriger Lösung gelingt durch Anwendung der Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry [50, 63, 83].

Für den Aktivitätsnachweis stehen mehrere photometrische Methoden zur Verfügung, beispielsweise das chromogene Substrat  $N\alpha$ -Benzoyl-D,L-Arginin 4-Nitroanilidhydrochlorid (BAPA) mit einem Molekulargewicht von 435Da. Von diesem wird durch tryptische Aktivität Paranitroanilin abgespalten, das ein Absorptionsmaximum bei 420nm hat [81].

Trypsin gehört neben Chymotrypsin, Pepsin, Amino- und Carboxypeptidase sowie der Elastase zu den wesentlichen intestinal wirkenden Proteasen, die bei der Verdauung von Proteinen bei Säugetieren eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wird Trypsin eingesetzt als Standard-Protease beim Peptide-Mapping für die Proteinidentifizierung über Proteindatenbanken [12, 67]. Bekannt ist auch eine Anwendung als orales Medikament, in Verbindung mit Chymotrypsin (Wobenzym®), zur Behandlung entzündlicher Krankheiten, insbesondere des Bewegungsapparates. Ebenso besteht Anwendung in klinischen Studien als supportives Medikament in der Behandlung maligner Erkrankungen. Bei dieser oralen Anwendung spielen zwei unterschiedliche Aspekte eine wichtige pharmakokinetische Rolle. Zum einen muss das Enzym bis zu seiner Resorption vor der aggressiven Magensäure geschützt werden, zum anderen muss verhindert werden, dass das Enzym vor seiner Resorption proteolysiert wird.

## 2.4 Aufgabenstellung

Polyelektrolytmikrokapseln, die auf biologischen Templaten hergestellt werden, weisen wesentlich andere biophysikalische, immunologische und physikochemische Eigenschaften auf, als z.B. Kapseln, die auf Silica- oder Melaminpartikeln hergestellt werden. Für die Anwendung der PEMC ist oft eine Modifikation der PEMC-Oberfläche erforderlich. Es sollte untersucht werden, ob sich diese Biotemplat-PEMC für eine Weiterbeschichtung mit Polyelektrolyten eignen, also selbst als Template fungieren können. Als Polyelektrolyte sollen dabei PSS, Alginat, Dextransulfat und Trypsin verwendet werden.

Trypsin soll als Modellenzym verwendet werden, weil die mit diesem Protein gewonnenen Ergebnisse auf andere Systeme übertragen werden können und damit grundlegend neue Erkenntnisse auf biotechnologischen Gebiet ermöglichen.

Der konsequente Schichtenaufbau auf den PEMC ist nachzuweisen, da aus der Literatur bekannt ist, dass verschiedene Proteine in Gegenwart von anderen Polyelektrolyten desorbiert werden. Es soll die an den PEMC adsorbierte Menge an Trypsin bestimmt werden, um Aussagen formulieren zu können über die Zunahme des Enzyms je Schicht. Außerdem ist die Aktivität des Enzyms nach seinem Einbau in die Polyelektrolytschichten zu untersuchen und mit den Enzymaktivitäten in freier Lösung zu vergleichen.

Die Untersuchungen sollen mit adäquaten Methoden wie konfokale Laserscanningmikroskopie, Durchflusszytometrie, Partikel-Elektrophorese und Spektralphotometrie durchgeführt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Biologische und chemische Materialien

##### 3.1.1 Erythrozyten

Die Isolierung von Humanerythrozyten erfolgte aus dem Vollblut von freiwilligen Spendern, deren schriftliche Zustimmung vorliegt. Das Blut wurde mit EDTA anti-koaguliert, die Zellen bei 20°C abzentrifugiert (2100g, 10min) und das Plasma sowie der Buffy-coat abgehoben. Darauf folgte zweimaliges Waschen mit isotoner ( $\pi = 300\text{mosm}$ ) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (140mM NaCl, 5,6mM KCl, 5,8 mM Phosphatpuffer mit pH 7,4) im Verhältnis 1:10 (Erythrozytensediment : PBS). Schließlich wurde ein Hämatokritwert von ca. 30 % in PBS eingestellt.

##### 3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	M <sub>w</sub> [Da]	Bezugsquelle
Dimethyl Sulfoxide (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)		Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Entionisiertes Wasser (Bideist)		
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	24.380	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Glutaraldehyd (Grade I 2,5%)		
Na-Benzoyl-D,L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (DL BAPA)	434,9	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Natriumhypochloritlösung (NaOCl 12% Cl)		Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyallylaminohydrochlorid (PAH)	70.000	Pharmacia Fine Chemicals (Upsala, Schweden)
Polynatriumstyrensulphonat (PSS)	70.000	Pharmacia Fine Chemicals (Upsala, Schweden)
Total Protein Kit		Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Trypsin aus Rinderpancreas	24.000	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Tris-HCl-Puffer pH7,4 1 M		Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Kalziumchlorid wasserfreies Pulver (CaCl <sub>2</sub> )		Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium Borat decahydrat (B <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O Borax)	181	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)

Alginat	176	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
N-Acetyl-Ile-Glu-Pro-Asp-p-Nitroaniline (p-Nitroaniline)	635	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)
Dextranulphat (DxSO <sub>4</sub> )	500.000	Sigma Aldrich Chemie AG (Steinheim Deutschland)

**Tab. 1: Verwendete Chemikalien**

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Die Erythrozyten wurden mit Glutaraldehyd fixiert. Die Herstellung der Polyelektrolytmikrokapseln erfolgte aus PSS und PAH. Natriumhypochloritlösung (NaOCl) wurde zum Auflösen der Erythrozyten verwendet. Als fluoreszierendes Agens für mikroskopische Untersuchungen und flowzytometrische Messungen kam FITC markiertes Trypsin zum Einsatz. Für die quantitative Proteinbestimmung wurde „*total protein kit*“ nach der Methode von Lowry et. al. [50, 83] in Modifikation nach Onishi und Barr [63] ausgewählt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität diente DL-BAPA als chromogenes Substrat, von dem durch tryptische Aktivität p-Nitroaniline abgespalten wird. P-Nitroaniline zeigt in verdünnter wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei 410nm und kann dadurch photometrisch quantifiziert werden. Dimethyl Sulfoxid (DMSO) wurde benutzt, um die Löslichkeit von DL-BAPA in wässriger Lösung zu verbessern.

Für die Herstellung der Lösungen wurde entionisiertes, doppelt destilliertes Wasser verwendet (Delta-Select GmbH Pfullingen, Deutschland).

Die Mikrokapseln wurden mit PAH, PSS, Dextranulphat, Alginat und Trypsin beschichtet.

Für die Bestimmungen von Osmolaritäten wurde das Osmometer Osmomat 030-D (Gonotec, Berlin, Deutschland) verwendet.

### 3.1.3 Lösungen

Trypsin hat als Protease die Eigenschaft zu autolysieren [80, 84]. Dieser Prozess lässt sich durch Zugabe von Kalziumchlorid verlangsamen. Durch Zugabe des Salzes wird die Enzymaktivität stabilisiert. Allen Puffern wurde Kalziumchlorid bis zum Erreichen einer Gesamtkonzentration von 0,02 mol/l hinzugefügt, weil diese

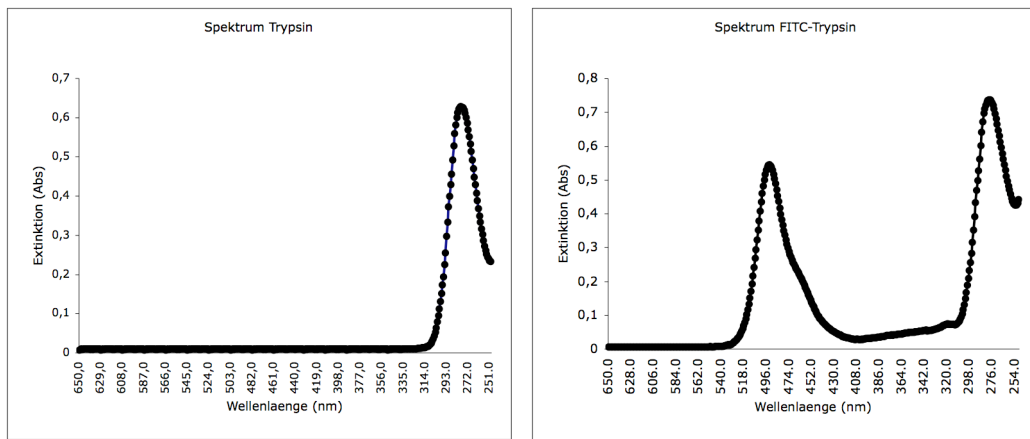
Konzentration zu einer ausreichenden Stabilisierung der Trypsinaktivität führt und die autolytische Aktivität gehemmt wird [84].

Die Polyelektrolytlösungen von PSS, Dextransulphat und Alginat wurden in 0,5M NaCl-Lösung auf 1 mg/ml eingestellt. Die für die Beschichtungen verwendete Trypsinlösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml.

Basis für die photometrischen Messungen und für die Polyelektrolytlösungen war ein Tris-HCl-Puffer. Die Einstellung der Molarität erfolgte auf 0,05 mol/l. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die potentia hydrogenii auf pH7,4 eingestellt. Zur Bestimmung der pH-Werte wurde das pH-Meter Knick 766 Calimatic mit einer SE100 Elektrode (Knick) und einer 3-Punkt Eichung (pH 4,01; 6,86 und 9,18) verwendet. Die Kontrolle der pH-Werte und die Bestimmung von Elektrolytkonzentrationen erfolgte mit dem Blutgasanalyseautomat ABL 725 der Firma Radiometer (Kopenhagen, Dänemark).

Zur Fluoreszeinmarkierung für Trypsin mussten zwei Lösungen hergestellt werden. Zunächst wurde 10mg Trypsin in 10ml TRIS-Puffer gelöst. Danach 1mg FITC, ebenfalls in 10ml TRIS-Puffer. Beide Lösungen sind zusammengegeben und 30min bei 4°C unter rühren inkubiert worden. Dann wurde das Lösungsgemisch in einen Dialyseschlauch (Cellu SepR T3, Membrane Filtration Products, Inc., Texas, U.S.A.) mit einem Permeationsmaximum für Moleküle bis maximal 12-14kDa überführt und 24 Stunden bei Dunkelheit und 4°C gegen 1,5l TRIS-Puffer dialysiert. Erneuern des Dialysepuffers nach 6h und nach 12h. Abschliessend konnte das Dialysat im Spektrophotometer analysiert werden. Der Trypsingehalt wurde durch Messung bei 280nm in einer Quarzküvette (Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) bestimmt, und danach ein Absorptionsspektrum im Bereich von 650-250nm aufgezeichnet (s. Abb. 5).

Das Spektrum des FITC-Trypsins zeigt den durch die Markierung hinzukommenden Peak bei 510nm, der dem Absorptionsmaximum des FITC entspricht [15, 71, 82].



**Abb. 5: photometrisch aufgezeichnete Wellenlängenspektren von Trypsin und FITC-Trypsin.** Trypsin zeigt ein Absorptionsmaximum bei etwa 280nm. Nach Anlagerung von FITC zeigt sich ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 510 nm. Dieses entspricht dem FITC-Absorptionsmaximum [82]. Konzentrationen ca. 0,5 mg/ml.

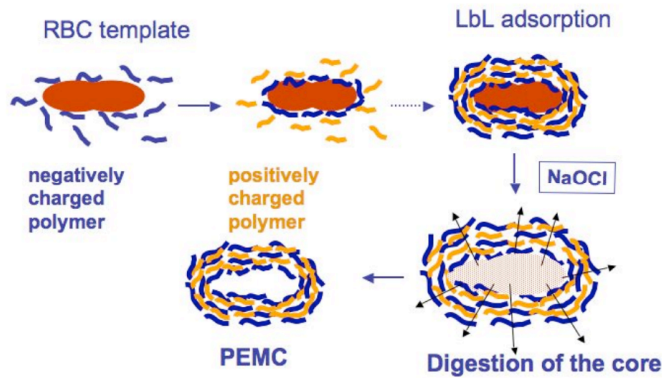
### 3.2 Herstellung der Polyelektrolytmikrokapseln

#### 3.2.1 Fixierung, Polyelektrolytbeschichtung und Auflösung des Kerns

Als Template für die Polyelektrolytmikrokapseln dienten humane Erythrozyten, die mit Glutaraldehyd (GA) fixiert waren. Zur Erythrozytensuspension wurde eine frisch angesetzte GA-Lösung (mit PBS auf 2,5 % verdünnt) tröpfchenweise unter ständigem Rühren zugegeben, bis zu einer GA-Endkonzentration von 2%. Nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten bei 20°C wurden die Zellen abzentrifugiert (170g, 5min) und dreimal mit entionisiertem Wasser gewaschen.

#### 3.2.2 Polyelektrolytbeschichtung fixierter Erythrozyten

In der Abb. 6 ist die Herstellung der Polyelektrolytmikrokapseln (PEMC) schematisch dargestellt. Fixierte Erythrozyten wurden konsekutiv mit den Polyelektrolyten PSS (-) und PAH (+) beschichtet, bis fünf Schichten aufgebaut waren ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS). Anschließend wurde der Kern mit NaOCl aufgelöst.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der konsekutiven Polyelektrolytanlagerung an die Erythrozytenmembran.** Aufgrund der negativen Ladung der Erythrozytenmembran bei pH7,4 wird der Schichtaufbau mit dem negativen Polyelektrolyten PSS begonnen. Darauf folgt die Beschichtung mit PAH. Dieser Vorgang wird alternierend wiederholt, bis die gewünschte Schichtzahl erreicht ist. Abschließend wird der Erythrozyt im Inneren der Kapsel durch NaOH aufgelöst [Bäumler et al. 2003].

Die Herstellung der PEMC erfolgte durch schichtweise Selbstassemblierung von entgegengesetzt geladenen Polyelektrolytmolekülen (PE-Moleküle) auf die Zellen in wässrigen Medien mit Hilfe einer Schwerkraftfiltration. Die Polyelektrolytadsorption wurde aus einer 1mg/ml PE-Lösung in 0,5M NaCl bei einer Templatkonzentration von 10 % (v/v) durchgeführt. Die PE-Endkonzentration betrug dann im Adsorptionsansatz ca. 0,5 mg/ml. Dieser Ansatz wurde zehn Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend musste die Suspension in einer Filtrationszelle (*Amicon*-Rührzelle, Beverly, USA) schonend über einen Nitrocellulosefilter (0,8 µm Porendurchmesser von *Millipore*, Bedford, USA) eingeeengt werden. Vor der Adsorption der nächsten, entgegengesetzt geladenen Polyelektrolytschicht, wurden die Kapseln zweimal in 100mM NaCl-Lösung gewaschen, um den überschüssigen PE-Anteil zu entfernen. Während der gesamten Prozedur musste auf Filterkuchenbildung geachtet werden. Ein weicher Pinsel wurde verwendet, um die Flockung der Partikel und die Adhäsion an der Filteroberfläche zu vermeiden. Auf diese Weise konnten die fixierten Erythrozyten mit SS als Polyelektrolytanionen im Wechsel mit PAH als Polyelektrolytkationen mit insgesamt 5 PE-Schichten ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS)beschichtet werden.

Um letztlich leere Polyelektrolytmikrokapseln zu erhalten, musste der Kern aufgelöst werden. Die mit Polyelektrolyten beschichteten fixierten Erythrozyten wurden dazu 60 Minuten mit einer Natriumhypochloritlösung unter Rühren bei Raumtem-

peratur inkubiert. Durch diese Prozedur werden die vernetzten Zellproteine oxidativ zu niedermolekularen Bestandteilen abgebaut, die dann durch die adsorbierte Polymerschicht diffundieren. Für diesen Zweck musste eine 1,2 % NaOCl-Lösung mit entionisiertem Wasser hergestellt und im Verhältnis 1:6 (Zellsuspension : NaOCl-Lösung) zu den beschichteten Erythrozyten gegeben werden. Am Ende wurden die Kapseln jeweils drei mal mit 154mM NaCl-Lösung und entionisiertem Wasser gewaschen (Zentrifugation bei 1500g, 5min).

### 3.2.3 Weiterbeschichtung der Polyelektrolytmikrokapseln

#### 3.2.3.1 Weiterbeschichtung mit Trypsin und einem Polyelektrolyt

Weitere Beschichtungsversuche wurden mit Trypsin und jeweils PSS oder Alginat als negativen Polyelektrolyten durchgeführt.

Die PEMC werden bei 4°C in einer Konzentration von etwa  $2 \times 10^{12}$ /l gelagert. Sie werden mittels Zentrifugation eingeeengt und der Überstand verworfen. Anschließend wird die erste Schicht Trypsin aufgebracht, indem eine Lösung von Trypsin in TRIS-Puffer (10mg/ml, pH7,4) auf das Pellet gegeben und gründlich gevortext wird. Es wurde eine Inkubationszeit von 15min bei 4°C gewährt. Nach Zentrifugation muss der Überstand abgehoben und die Kapseln drei mal mit destilliertem Wasser gespült werden, um überschüssiges Enzym zu entfernen. Die Polyelektrolytschicht wird aufgebracht, indem die PEMC in 1,5ml der jeweiligen Polyanionenlösung resuspendiert und 15min bei 4°C inkubiert wurden. Es folgt wieder ein dreimaliges Waschen, um überschüssiges Polyelektrolyt zu entfernen. Zum Aufbringen der nächsten Trypsinschicht wird verfahren wie bei der ersten. Dieses Protokoll wird wiederholt, bis die gewünschte Anzahl Schichten aufgebracht ist.

Sollten die beschichteten PEMC, deren äußerste Schicht Trypsin ist, einer Proteinbestimmung nach Lowry (s. 2.3.4.3) unterzogen werden, müssen sie vor Probenentnahme zur Sicherheit viermal gewaschen.



### 3.2.3.2 Weiterbeschichtung mit FITC-markiertem Trypsin und einem Polyelektrolyten

Die Beschichtung mit FITC-Trypsin und einem Polyelektrolyt wird analog zu dem Protokoll für die Beschichtung mit nicht markiertem Enzym durchgeführt. Zum Schutz vor Autolyse müssen ebenfalls stets 4°C eingehalten werden. Um die Fluoreszenz des Fluoreszeins zu erhalten, muss nicht nur in lichtgeschützten Behältnissen gearbeitet werden, sondern auch absolute Dunkelheit gewährleistet sein bei der Lagerung der Proben.

## 3.3 Methoden zur Charakterisierung der Polyelektrolytmikrokapseln

### 3.3.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) zeichnet sich im Vergleich zur Durchlicht- und zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie durch eine erhöhte optische Auflösung aus. Durch das konfokale Prinzip (Abb. 7) werden 3D-Objekte in einen Stapel optischer, konfokaler Schnittebenen zerlegt, um jeweils nur die Informationen aus einer Fokusebene sammeln zu können. Ein Laserstrahl wird über einen Strahlteiler, der die Wahl der korrekten Wellenlänge erlaubt, durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Wird nun von einem fluoreszenzmarkierten Präparat Licht emittiert, durchläuft es zunächst dieselbe Optik, trifft auf eine konfokale Lochblende (Pinhole) und wird schließlich vom Photomultiplier verarbeitet. Durch die Einstellung des Pinholes kann die Reduktion des Streulichtes aus nicht im Fokus liegenden Ebenen festgelegt werden. Um ein Bild der Probe zu sehen, wird die Fokusebene gescannt. Dabei tastet der Laserstrahl das Objekt punkt- und zeilenweise ab. Durch schrittweises Verschieben der Fokusebene sind zudem 3D-Visualisierungen und Animationen möglich [93].

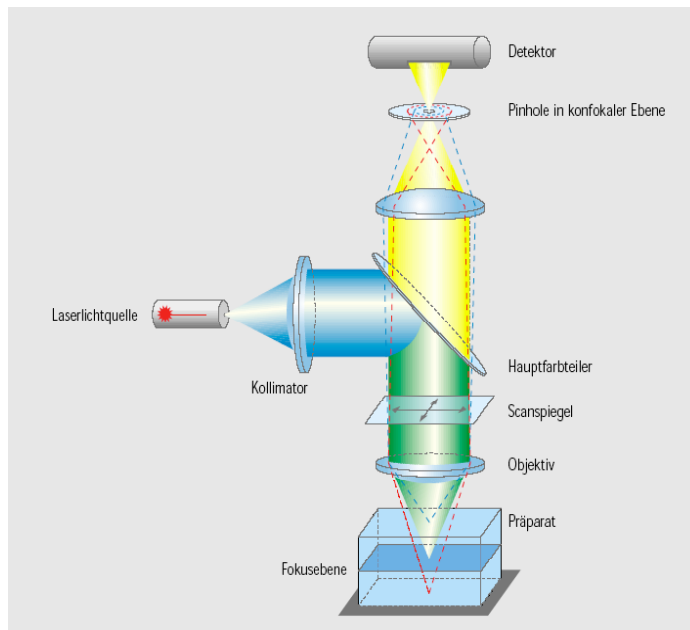


Abb. 7: **Strahlengang in einem CLSM.** Das konfokale Prinzip beruht darauf, dass bei Untersuchung dreidimensionaler Objekte nur jeweils eine optische Ebene abgebildet wird. Es werden Überschneidungen verhindert und es gelingt, Schnittebenen einzelner Zellen zu untersuchen. [93]

Es wurde am *LSM 510* der Firma *Carl Zeiss GmbH* (Jena, Deutschland) gearbeitet. Dieses System ist mit einem inversen Mikroskop ausgestattet. Im Einsatz waren ein 100 $\times$  Ölimmersionsobjektiv und ein 63 $\times$  LD-Objektiv. Das FITC markierte Trypsin wurde mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) zur Emission angeregt.

#### 3.3.1.1 Bestimmung von Zellzahlen

Um die Zellzahlen der verwendeten Kapselsuspensionen zu bestimmen, wurde nach gründlichem Durchmischen der Probenbehältnisse ein Aliquot von etwa 50 $\mu$ l entnommen und in eine Ballast-Zählkammer mit einer Dicke von 0,1mm gegeben. Es folgte eine Sedimentationszeit von 12h. Unter Zuhilfenahme des CLSM wurde die Zählkammer vorerst orientierend auf gleichmäßige Verteilung der Kapseln untersucht. Bei gleichmäßiger Verteilung konnten zur Bestimmung der Zellzahl dann 30 Gesichtsfelder von 147 x 147  $\mu$ m aufgenommen und die enthaltenen Zellen gezählt werden. Abschließend wurde durch Mittelwertbildung die entsprechende Zellzahl der Probe berechnet und auf das Volumen von 147 x 147 x 100 $\mu$ m bezogen.

### 3.3.1.2 Untersuchung von Fluoreszenzsignalen an weiterbeschichteten PEMC

Mit FITC-Trypsin beschichtete PEMC werden dunkel mikroskopiert und durch das Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt. Es ist möglich, Z-Stack Aufnahmen anzufertigen, die einzelne PEMC schichtweise darstellen.

Die Software des Mikroskops (LSM-META, Zeiss, Jena) ermöglicht eine Technik, mit der die Intensität des Fluoreszenzsignals von PEMC mit unterschiedlich vielen FITC-Trypsin Schichten ordinal dargestellt werden kann. Um dies zu ermöglichen, wird die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors so eingestellt, dass die Probe mit der am größten prognostizierten Fluoreszenzintensität gerade noch überstrahlungsfrei detektiert wird. Diese Einstellung der Empfindlichkeit kann nun gespeichert werden und bei jeder folgenden Probe wieder abgerufen werden. Die entstehenden Bilder geben einen guten Eindruck über den Zuwachs der Fluoreszenz bei steigender Anzahl der FITC-Trypsin Schichten.

Ferner kann die Intensität des Fluoreszenzsignals quantitativ bestimmt werden. Die Software ermöglicht die Ausgabe eines Histogramms, das die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Aufnahme darstellen kann. Es wird ein relativer Wert ausgegeben. Entlang einer in die Aufnahme gelegten Linie kann die Fluoreszenzintensität entlang dieser quantifiziert werden [93].

### 3.3.2 Zellelektrophorese

Die Zellelektrophorese ist eine Methode zur Bestimmung der Oberflächenladung eines Teilchens anhand seiner Mobilität in einem definierten äußeren elektrischen Feld. Die elektrophoretische Beweglichkeit ergibt sich aus der Geschwindigkeit  $\overset{!}{v}$  und der elektrischen Feldstärke  $\overset{!}{E}$ :

$$b = \frac{\overset{!}{v}}{\overset{!}{E}}.$$

Sie ist abhängig von der Oberflächenladung der Partikel und wird beeinflusst durch die Eigenschaften der umgebenden Lösung (pH-Wert, Ionenstärke und Viskosität). Die Oberflächenladung kann unter bestimmten Bedingungen aus dem  $\zeta$ -Potential berechnet werden [8, 26, 61]. Aus der Helmholtz-Smoluchowski-Theorie der Zellelektrophorese ergibt sich für das  $\zeta$ -Potential in Abhängigkeit von der elektrophoretischen Beweglichkeit  $b$  folgender Zusammenhang:

$$\zeta = \frac{b\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0}.$$

Dabei ist  $\eta$  die Viskosität der Messlösung,  $\varepsilon_r$  die Dielektrizitätskonstante und  $\varepsilon_0$  die elektrische Feldkonstante [38].

Die Messungen der elektrophoretischen Beweglichkeit erfolgten mit dem Zellelektrophoresegerät *ELEKTROPHOR* der Firma *HaSoTec* (Rostock, Deutschland) [38], dessen Technik auf einem Echtzeitbildverarbeitungssystem und einer speziellen Trackingprozedur beruht. Bei dieser Apparatur wird die Bewegung mehrerer Einzelzellen über ein Mikroskop und eine Videokamera erfasst. Die Bilder werden simultan bei jedem Messzyklus digitalisiert und analysiert.

Die Elektrophoresekammer wird kontinuierlich temperiert, so dass die Beweglichkeit nicht durch Viskositätsänderungen beeinflusst wird. Die Messkammer ist von den Elektroden durch ionendurchlässige Membranen getrennt, damit Elektrolyseprodukte nicht die Oberflächeneigenschaften der Zellen beeinflussen. Grundsätzlich entstehen in der Kammer elektroosmotische Strömungen aufgrund negativer Oberflächeneigenschaften des Glases. Analysen von Strömungsprofilen zeigen, dass es strömungsfreie (stationäre) Ebenen gibt [39]. Diese müssen vor Beginn jeder Messung eingestellt werden, da nur dort die elektrophoretische Bewegung störungsfrei ist. Nach Angaben des Herstellers befindet sich bei dieser Messkammer die stationäre Ebene genau in der Mitte der Messkammer. Zur Kontrolle der Messungen ist es erforderlich, vorerst Eichpartikel zu messen. Dazu wurden fixierte Erythrozyten in PBS (140mM NaCl, 5,6mM KCl, 5,8mM Phosphatpuffer mit pH 7,4) verwendet.

Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 20°C in PBS. Für einen Mobilitätswert wurden zur statistischen Absicherung mindestens 180 Partikel gemessen. Durch den Probenaustausch zwischen den Messzyklen wird ausgeschlossen, dass ein Teilchen mehrfach erfasst wird. Der Mittelwert der elektrophoretischen Mobilität und die Standardabweichung wurden off-line im Programm *E4MES* von *HaSoTec* bestimmt.

### 3.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

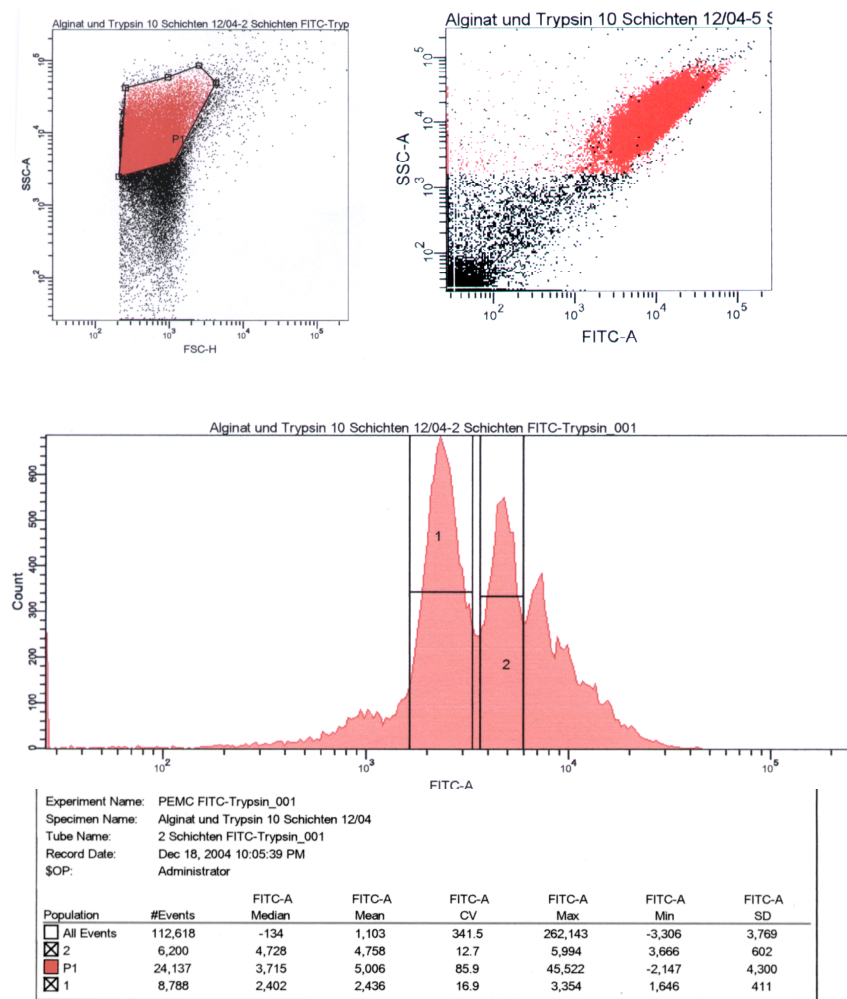
Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension. Sie erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität und mehrerer verschiedener Fluoreszenzsignale.

Das Messprinzip des Flowzytometers (Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)) besteht darin, dass die zu messenden Zellen bzw. Partikel umgeben von einem Hüllstrom durch eine Küvette gedrückt werden. Der Hüllstrom dient einerseits der Beschleunigung der Partikel, andererseits der Auflösung von Aggregaten. Dieser Vorgang wird hydro-dynamische Fokussierung genannt. Der dabei entstehende Strom aus einzelnen Partikeln passiert in der Küvette einen monochromatischen Laserstrahl, der jedes Partikel einzeln erfasst. Trifft der Laserstrahl auf ein passierendes Partikel, so entsteht Streulicht. Dieses Streulicht wird von Detektoren mindestens zweier Kategorien registriert, dem Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter SSC). Das Vorwärtsstreulichtsignal ist vornehmlich von der Partikelgröße, das Seitwärtsstreulicht mehrheitlich von der Granularität des jeweiligen Partikels abhängig.

Zusätzlich können mehrere Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen simultan registriert werden.

Das Flowzytometer misst in Kanälen unterschiedlicher Empfindlichkeit und kann dadurch das Fluoreszenzsignal quantifizieren.

Für die flowzytometrischen Messungen wurde ein FACS-Canto der Firma BD (USA) genutzt. Die Software FACS-Canto-DIVA wertet die gemessenen Signale aus. Die Messprozedur beginnt, indem man einen Scatterplot aufzeichnet, in welchem die gemessenen Partikel aufgetragen und in einem doppelt logarithmischen Diagramm (SSC gegen FSC) dargestellt werden (Abb. 8). In diesem Scatterplot kann man die zu messenden Partikel gaten und dadurch verhindern, dass Verunreinigungen oder Zelltrümmer in die Analyse eingehen [9].



**Abb. 8: Darstellungsoptionen der Software FACS-Diva.** Oben links: Darstellung der gemessenen SSC/FSC-Streulichtwerte der Partikel mit angelegtem Gate P1, in dem die zu untersuchenden Partikel lokalisiert sind. Oben rechts: Darstellung der Fluoreszenzintensität und des SSC derselben Partikel. Rot dargestellt sind die Partikel innerhalb des Gates P1. Mitte: Histogramm der Fluoreszenzintensitäten der Partikel innerhalb des Gates P1 mit Messintervallen 1 und 2, die einzelne PEMC und Doublets darstellen. Unten: statistische Auswertung der Daten aus P1, Messintervall 1 und 2 sowie der Gesamtpartikel.

Im nächsten Schritt wurde ein weiteres Diagramm erstellt, welches das Fluoreszenzsignal der im Bereich des angelegten Gates liegenden Partikel in Form eines Histogramms darstellt. Die Abb. 8 zeigt ein solches Histogramm. Durch Eingrenzen eines Peaks kann man nun den Peak-Kanal (Peak-Ch) und die Standardabweichung (SD) dieses Peaks auslesen. In der Regel entstehen mehrere Peaks, die ebenfalls vermessen werden. Man sieht, dass der nächste jeweils höhere Peak im Vergleich zum vorigen einen doppelt so hohen Peak-Kanal anzeigt. Daher geht man davon aus, dass die folgenden Peaks kleine Zellaggregate (Doublets, Triplets) darstellen.

### 3.3.4 Photometrische Messungen

Für die photometrischen Messungen wurde das Spektrophotometer K2800 der Firma Hitachi (Tokio, Japan) genutzt. Die Software des Gerätes ermöglicht über die Photometrie bei fester Wellenlänge hinaus das automatische Messen der Extinktion nach einem Zeitplan (Kinetik Modus) sowie das Aufzeichnen von Spektren in einem Wellenlängenbereich von 1100-190nm [40].

#### 3.3.4.1 Bestimmung der Trypsinkonzentration in wässrigen Lösungen

Die Konzentration wässriger Proteinlösungen lässt sich photometrisch bestimmen. Gemessen wird in Quarzküvetten (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 280nm. Voraussetzung ist, dass die Konzentrationen gering sind und die Lösungen klar. Vorbereitend muss eine Reihe definierter Trypsinlösungen (inklusive Leerwert) hergestellt und deren Extinktionen bestimmt werden. Graphisch lässt sich daraus eine Kalibrierungsgerade erstellen und aus dieser der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  berechnen.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt, wie sich aus einer gemessenen Extinktion die Trypsinkonzentration berechnen lässt:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit

E : Extinktion

$\epsilon$  : der Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$ ]

c : die Konzentration [mmol/l] und

d : die Dicke [cm] der Küvette.

#### 3.3.4.2 Bestimmung der Konzentration von p-Nitroanilin

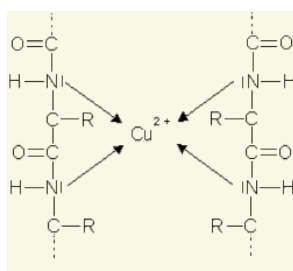
Das Vorgehen zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von p-Nitroanilin in einer wässrigen Lösung ist analog dem zur Bestimmung der Trypsinkonzentration. Die Verfahren unterscheiden sich darin, dass hier bei einer

Wellenlänge von 420nm gemessen wird, da p-Nitroanilin in diesem Wellenlängenbereich ein Absorptionsmaximum aufweist. In diesem Wellenlängenbereich wird in Acryl-Küvetten (Saarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) gemessen.

#### 3.3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die einfache photometrische Bestimmung der Trypsinkonzentration versagt in einer Suspension von PEMC in wässriger Lösung, da diese Suspensionen trübe sind. PEMC zeigen ein Spektrum mit ansteigenden Extinktionswerten in einem Wellenlängenbereich unter 350nm, die mit der Extinktionsbestimmung des Proteins bei 280nm interferieren. Bei größeren Wellenlängen zeigen sie im verwendeten Konzentrationsbereich keine nennenswerte Extinktion. Weil die Trypsinkonzentration bei Verwendung der Methode nach Lowry [50] bei 750nm bestimmt werden kann, beeinflussen die in der Suspension enthaltenen Kapseln die Messung nicht.

Die Methode nach Lowry besteht aus einer Kombination der klassischen Biuret-Reaktion mit einem Nachweisverfahren für phenolische Aminosäuren mittels Folin-Phenol Reagens. Peptide und Proteine reagieren mit  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Medium unter Bildung eines blauvioletten Komplexes. Das Peptid muss mindestens zwei Peptidbindungen besitzen, damit der Komplex entsteht. Abb. 9 illustriert die Bildung des blauvioletten Komplexes.



**Abb. 9: Schematische Darstellung des blauviolettfarbenen Komplexes**, auf dessen Entstehen die Proteinbestimmung nach Lowry beruht. Sein Zentralatom ist ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion, seine Liganden vier Elektronenpaare von Stickstoffatomen vierer Peptidbindungen.

Weiterhin wurden von allen verwendeten Lösungen Spektren aufgezeichnet, die eine Basislinienextinktion bei 810nm nachweisen.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 200µl der zu messenden Kapselsuspension mit 2200µl der Lowryreagenz 10min bei 20°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100µl Folin-Phenol-Reagenz dazugegeben und weitere



30min bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionswerte der Probenlösungen innerhalb von 30min bei einer Wellenlänge von 810nm im Spektrophotometer gemessen.

#### 3.3.4.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der tryptischen Aktivität wurde das chromogene Trypsin-Substrat N $\alpha$ -Benzoyl-D,L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (DL-BAPA;  $M_W = 434,9\text{Da}$ ) eingesetzt. Von diesem Substrat wird durch tryptische Aktivität N-Acetyl-Ile-Glu-Pro-Asp -p-Nitroanilide (p-Nitroaniline; pNA;  $M_W = 63,46\text{Da}$ ) abgespalten, das ein Absorptionsmaximum bei 420nm aufweist [28]. So kann es leicht photometrisch quantifiziert werden.

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 0,0109g DL-BAPA in 1ml Dimethyl Sulfoxid (DMSO) unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst und anschließend mit 49ml eines der verwendeten Puffer verrührt. Die so erhaltene Lösung enthält 0,5mMol/l DL-BAPA.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird eine konstante Temperatur von 25°C aller Lösungen mithilfe eines Wasserbades eingestellt. Auch die Raumtemperatur wird auf etwa 25°C eingestellt. Nach Kontrolle von Raum- und Wasserbadtemperatur mithilfe von Thermometern werden 200 $\mu$ l der zu messenden trypsinhaltigen PEMC-Suspension in eine Küvette gegeben. Diese wird im Strahlengang des Photometers stehend mit 800 $\mu$ l der Substratlösung gründlich vermengt. Unverzögert wird die Extinktionsmessung bei 410nm gestartet. Für 240s wird der Extinktionswert alle 2 Sekunden aufgezeichnet. Innerhalb eines initialen und linearen Reaktionsabschnittes kann der Extinktionszuwachs pro Zeit (Aktivität,  $\Delta E/s$ ) bestimmt werden. Diese Aktivitätsangabe lässt sich dann aufgrund des Lambert-Beer'schen Gesetzes in die für Enzymaktivitäten übliche Einheit Unit ( $U = \mu\text{mol/min}$ ) umrechnen.

#### 3.3.4.5 Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Polyanionen auf die Enzymaktivität

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Polyanionen auf die Enzymaktivität wurden diese in aufsteigender Konzentration nach angegebenem Schema

mit Trypsin vermengt und für 15min bei 4°C inkubiert. Anschließend konnte die Aktivität photometrisch nach dem standardisierten Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität (s. 2.3.4.4) bestimmt werden.

Ansatz	Trypsin 10 mg/ml	Polyelektrolyt 1 mg/ml	TRIS pH 7,4
1	50	10	190
2	50	20	180
3	50	30	170
4	50	40	160
5	50	50	150
6	50	100	100

**Tab. 2: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses des Polyanions auf die Enzymaktivität.** Angaben in µl. Eingeschlossen wird ein Ansatz ,0' ohne Zugabe eines Polyelektrolyten.

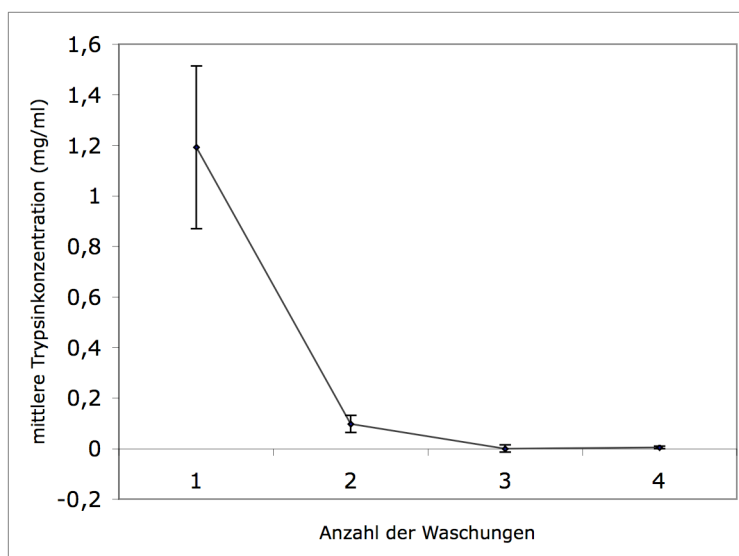
## 4 Ergebnisse

Die Trypsinkonzentration der bei den Beschichtungsprozeduren entstehenden Überstände (s. 2.2.2) wurde photometrisch ermittelt und der Einfluss unterschiedlicher Polyelektrolytlösungen auf die Aktivität des Trypsins bestimmt. Die Weiterbeschichtung wurde mittels Zellelektrophorese und CLSM verfolgt und die PEMC nach der Weiterbeschichtung flowzytometrisch, mikroskopisch und photometrisch auf ihren Trypsingehalt untersucht. Danach konnte die Aktivität des an den PEMC immobilisierten Enzyms mit der des freien Enzyms verglichen und Auswirkungen des pH-Wertes auf die Enzymaktivität untersucht werden.

### 4.1 Untersuchung der Trypsinkonzentration in Überständen der Waschzyklen

PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) wurden nach angegebenem Protokoll (s. 4.2.2.1) mit Trypsin und PSS weiterbeschichtet. Die Trypsinkonzentration der bei den Waschprozeduren abgehobenen Überstände wurde photometrisch bestimmt (s. 4.3.4.1), um sicher zu sein, dass sich vor Aufbringen der ersten Polyelektrolytschicht kein

freies Enzym mehr in der Suspension befindet. Freies, also nicht an die PEMC gebundenes Enzym, würde zu falsch hoch gemessenen Trypsinkonzentrationen führen. Es zeigte sich, dass bereits nach dreimaligem Waschen nur noch sehr geringe Beträge der Enzymkonzentration nachweisbar waren (Abb. 10), wobei die Werte bereits unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Nach viermaligem Waschen lagen die Werte ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Das heißt, dass die Trypsinkonzentration in der Suspension nach dreimaligem Waschen so gering ist, dass sie die folgenden Messungen nicht beeinflusst. Die Messwerte des dritten und vierten Überstandes sind mit 0,00 angegeben. Bei einer Standardabweichung von 0,01 liegen sie dadurch unterhalb der Nachweisgrenze dieser Messung.



**Abb. 10: photometrisch gemessene Trypsinkonzentration in den Überständen.**  
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Trypsinkonzentrationen in mg/ml. n=10

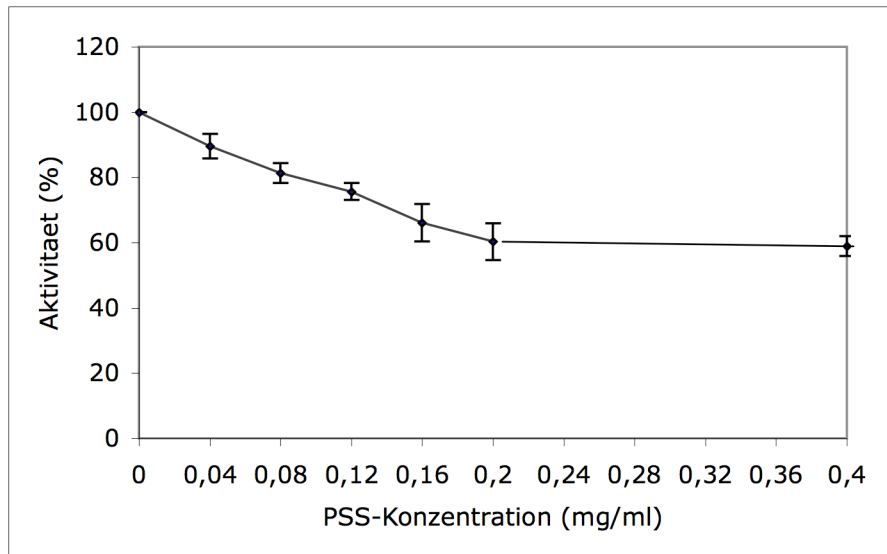
(Messwerte: 1= 1,19±0,32; 2= 0,10±0,03; 3= 0,00±0,01; 4= 0,00±0,01)

## 4.2 Einfluss unterschiedlicher Polyanionen auf die Enzymaktivität

Der Einfluss der Polyanionen PSS, Alginat und Dextranulphat auf die Enzymaktivität wurde untersucht (s. 4.3.4.5)

### 4.2.1 PSS

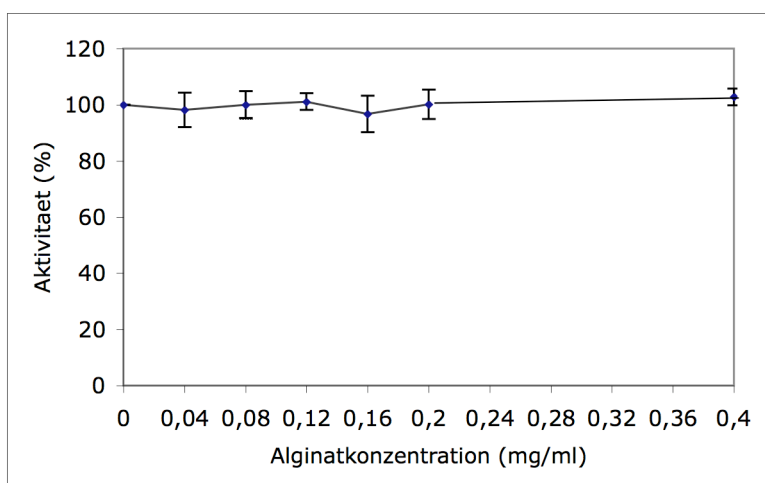
Die tryptische Aktivität nimmt mit steigender PSS Zugabe ab. Sie sinkt anfangs moderat und fällt schließlich bei einer PSS-Konzentration von 0,2 mg/ml auf 59% im Vergleich zum Leerwert ab (s. Abb. 11). Die Aktivität bei 0,2mg/ml und die bei 0,4mg/ml unterscheiden sich nicht signifikant.



**Abb. 11: Einfluss der PSS-Konzentration auf die Trypsinaktivität.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=4. Konzentrationsangaben in mg/ml. Abszisse: prozentuale Aktivität im Vergleich zum Kontrollwert ohne PSS-Zugabe. Die Aktivitätsbestimmung wurde im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 420nm über 180 Sekunden durchgeführt. pH 7,4

#### 4.2.2 Alginat

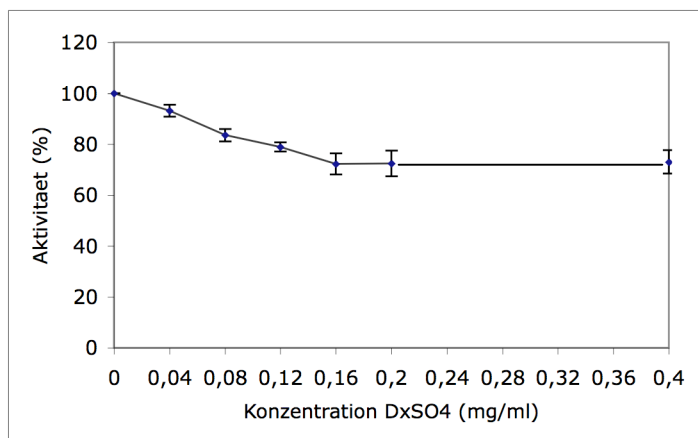
Bei Untersuchung der Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Alginatkonzentration war kein Trend erkennbar. Die Aktivität war im Bereich von 0–0,4 mg/ml Alginat unabhängig von der Alginatkonzentration. Sie liegt zwischen 97 und 101%, gemessen an der Enzymlösung ohne Zugabe von Alginat (Leerwert).



**Abb. 12: Einfluss der Alginat-Konzentration auf die Trypsinaktivität.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=4. Konzentrationsangaben in mg/ml. Abszisse: prozentuale Aktivität im Vergleich zum Kontrollwert ohne Alginat-Zugabe. Die Aktivitätsbestimmung wurde im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 420nm über 180 Sekunden durchgeführt.

#### 4.2.3 Dextransulphat

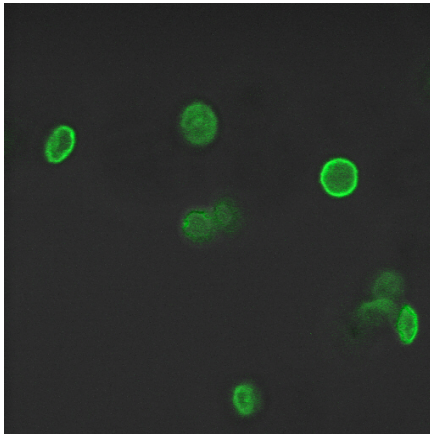
Bei der Untersuchung der Trypsinaktivität bei steigender Konzentration von Dextransulphat zeigt sich ein ähnlicher Zusammenhang wie in 4.1.1. Auch hier sinkt die Enzymaktivität mit steigender Polyanionenkonzentration. Die Aktivität sinkt in beiden Fällen mit ähnlicher Dynamik. Bei Zugabe von 100µl Dextransulphat sinkt die Aktivität auf 72% im Vergleich zum Leerwert (s. Abb. 13). Auch in diesem Fall ändert sich die Aktivität zwischen den Polyelektrolytkonzentrationen 0,2 und 0,4 mg/ml nicht wesentlich.



**Abb. 13: Einfluss der Dextransulphat-Konzentration auf die Trypsinaktivität.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=4. Konzentrationsangaben in mg/ml. Abszisse: prozentuale Aktivität im Vergleich zum Kontrollwert ohne Dextransulphat-Zugabe. Die Aktivitätsbestimmung wurde im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 420nm über 180 Sekunden durchgeführt. pH 7,4

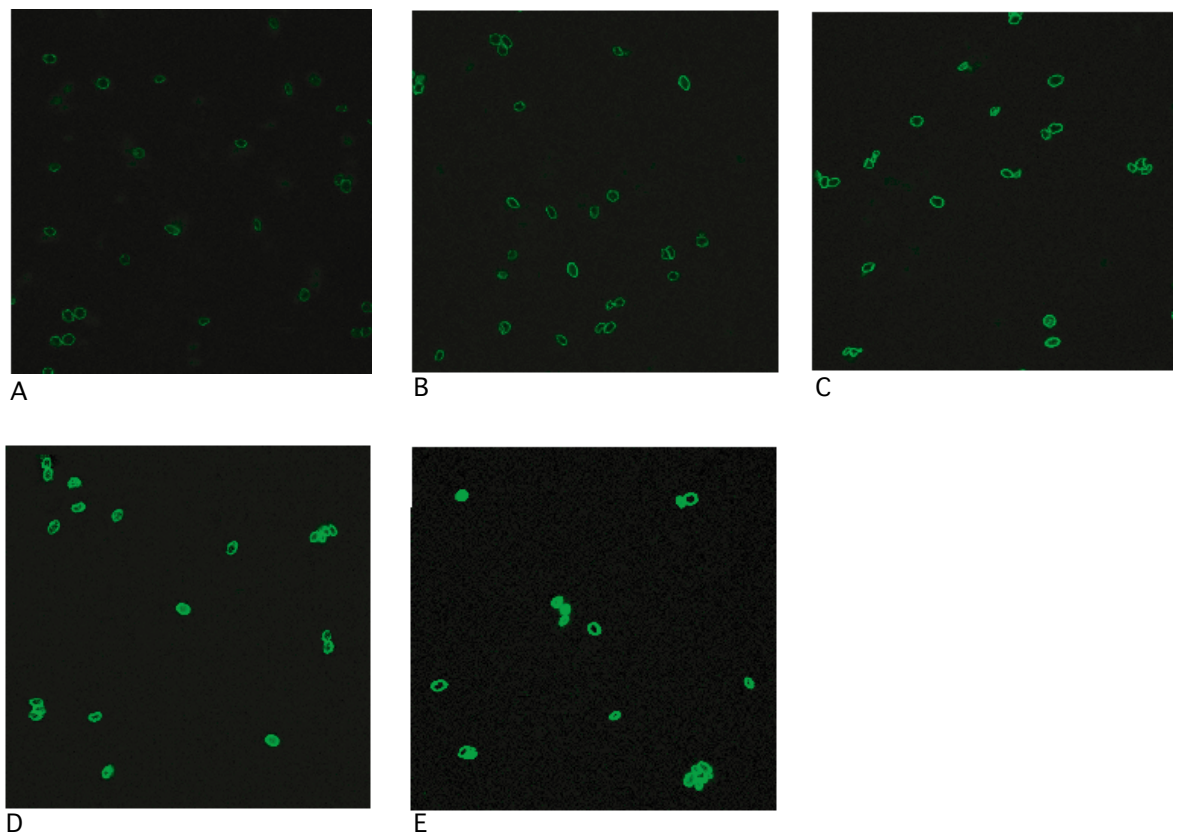
#### 4.3 Untersuchungen mittels CLSM

PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) wurden nach angegebenem Protokoll (s. 4.2.2.2) mit FITC-Trypsin und PSS weiter beschichtet. Dabei wurden PEMC mit bis zu zehn Schichten FITC-Trypsin entnommen, deren abschließende Schicht jeweils PSS war. Es zeigt sich eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz. Das Fluoreszenzsignal ist an den PEMC deutlich erkennbar. Beim schichtweisen Untersuchen der PEMC lässt sich das Fluoreszenzsignal in bzw. an der Membran lokalisieren (Abb. 14). Im inneren der Mikrokapseln ist die Fluoreszenz im Vergleich zum Hintergrundsignal stärker.



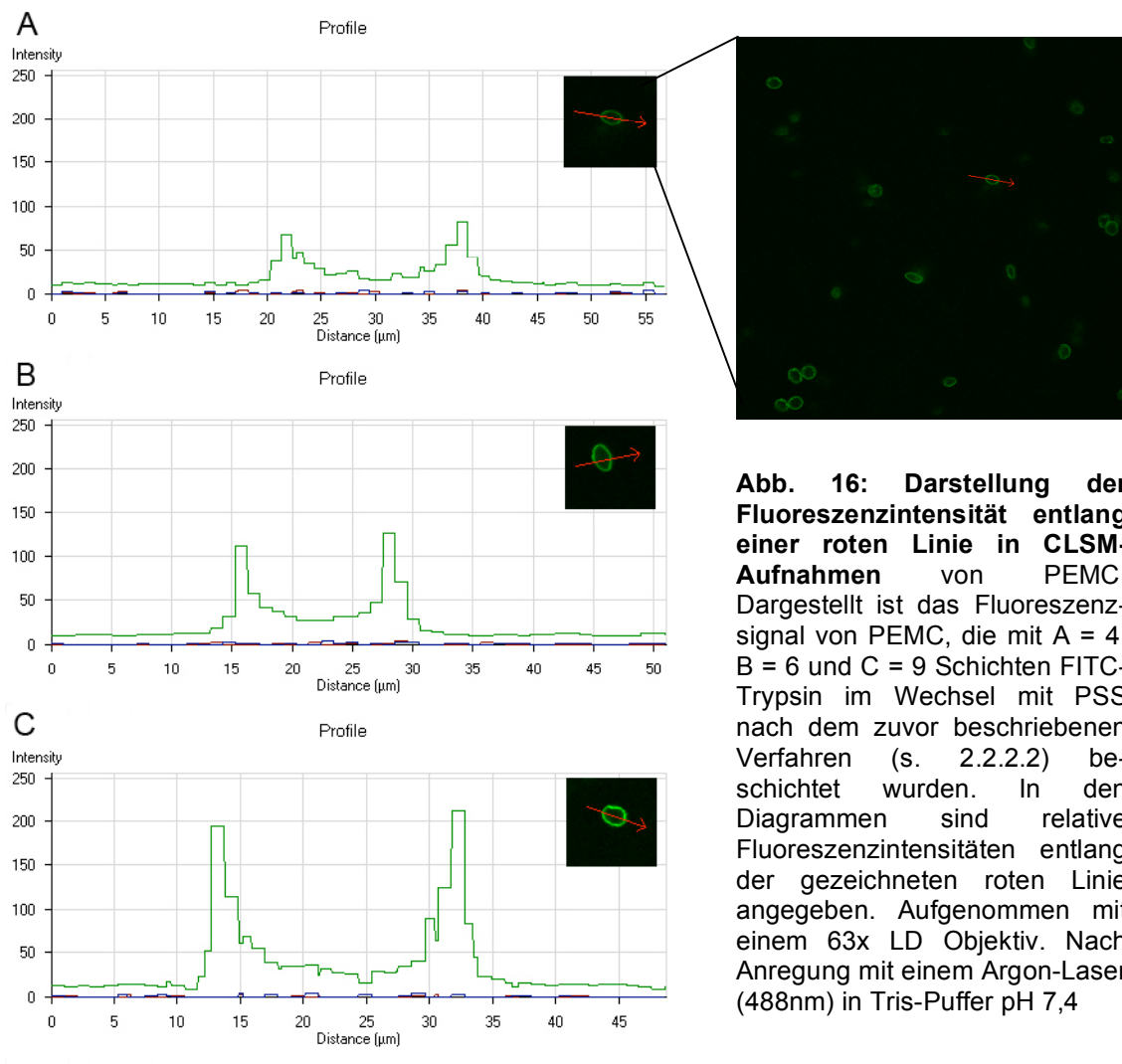
**Abb. 14: Lokalisation des Fluoreszenzsignals.** Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von PEMC, die mit 5 Schichten FITC-Trypsin im Wechsel mit PSS nach dem zuvor beschriebenen Verfahren (s. 2.2.2.2) beschichtet wurden. Nach Anregung mit einem Argon-Laser (488nm) in Tris-Puffer pH 7,4. Aufgenommen mit einem 100x Ölimmersions-Objektiv.

Unter Verwendung der in 4.3.1.3 beschriebenen Aufnahmebedingungen lassen sich die Fluoreszenzintensitäten vergleichen. Dargestellt sind Bilder von PEMC mit unterschiedlicher Anzahl von FITC-Trypsin Schichten (Abb. 15). Auf Bildern von PEMC mit weniger als vier Schichten lassen sich die Kapseln nicht identifizieren, da das von Ihnen emittierte Signal bei der vorgegebenen Sensitivität zu schwach ist. Man erkennt deutlich einen Zuwachs der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Anzahl der FITC-Trypsin Schichten.



**Abb. 15: Intensität des Fluoreszenzsignals.** Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von PEMC, die mit a= 4 Schichten, b= 6 Schichten, c= 7 Schichten, d= 9 Schichten und e= 10 Schichten FITC-Trypsin im Wechsel mit PSS beschichtet wurden. Nach Anregung mit einem Argon-Laser (488nm) in Tris-Puffer pH 7,4. Aufgenommen mit einem 63x LD Objektiv unter Konstanthaltung der Belichtungseinstellungen nach zuvor beschriebenem Verfahren.

Durch graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität, gemessen entlang einer Linie in den Aufnahmen (Abb. 16), lässt sich diese Zunahme der Fluoreszenz verdeutlichen. Im Linienvverlauf wird zunächst das Hintergrundsignal, dann die Wand der PEMC, ihr Binnensignal, der zweite Wandanschnitt, und abschließend wieder das Hintergrundsignal detektiert. Deutlich zu erkennen ist die zunehmende Fluoreszenzintensität der Kapselwand mit zunehmender Schichtanzahl. Gleichzeitig kann man das Binnensignal gut vom Hintergrundsignal unterscheiden. Auch das Binnensignal steigt mit zunehmender Schichtanzahl.



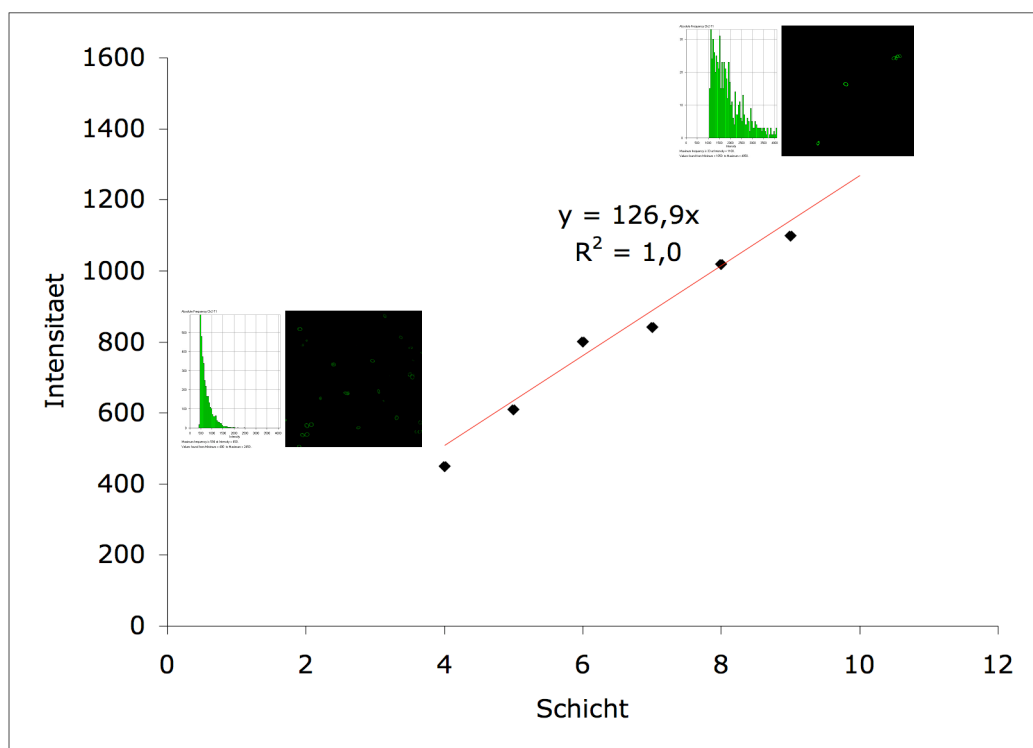
**Abb. 16: Darstellung der Fluoreszenzintensität entlang einer roten Linie in CLSM-Aufnahmen von PEMC.** Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von PEMC, die mit A = 4, B = 6 und C = 9 Schichten FITC-Trypsin im Wechsel mit PSS nach dem zuvor beschriebenen Verfahren (s. 2.2.2.2) beschichtet wurden. In den Diagrammen sind relative Fluoreszenzintensitäten entlang der gezeichneten roten Linie angegeben. Aufgenommen mit einem 63x LD Objektiv. Nach Anregung mit einem Argon-Laser (488nm) in Tris-Puffer pH 7,4

Mit Hilfe der Auswertungssoftware wurden Histogramme dargestellt, die eine Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Aufnahme aufzeichnen. Dafür müssen Maximal- und Minimalwerte des auszuwertenden Intensitätsspektrums angegeben werden, damit nicht immer das Hintergrundsignal

als häufigste Fluoreszenzintensität innerhalb der Aufnahme angegeben wird.

Aus den Histogrammen lässt sich dann die relative Intensität der am häufigsten detektierten Fluoreszenzsignale entnehmen (s. Abb. 17).

Die graphische Darstellung der aus den Histogrammen entnommenen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtzahl zeigt eine mit zunehmender Schichtzahl auch zunehmende Fluoreszenzintensität für Schichtzahlen zwischen vier und zehn (Abb. 17). Diese Zunahme lässt sich mit einer Trendlinie anpassen, deren Geradengleichung in der Abbildung angegeben ist. Das Bestimmtheitsmaß für die Messwerte auf dieser Geraden beträgt 0,98.



**Abb. 17: Darstellung der häufigsten Fluoreszenzintensitäten aus CLSM-Aufnahmen von PEMC**, die alternierend mit FITC-Trypsin und PSS beschichtet wurden. Dargestellt sind relative Fluoreszenzintensitäten. Ihnen wurde eine lineare Trendlinie angepasst, die rot in der Abbildung dargestellt ist. Ihre Geradengleichung ist in der Abbildung angegeben. Das Bestimmtheitsmaß dieser Trendlinie beträgt 0,98. Intensitätsangaben sind relative Werte ohne Einheit, die Schichtzahl bezeichnet die Anzahl aufgebrauchter FITC-Trypsin Schichten. Die klein dargestellten Histogramme zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensität für PEMC mit 4 bzw. 9 Schichten FITC-Trypsin.

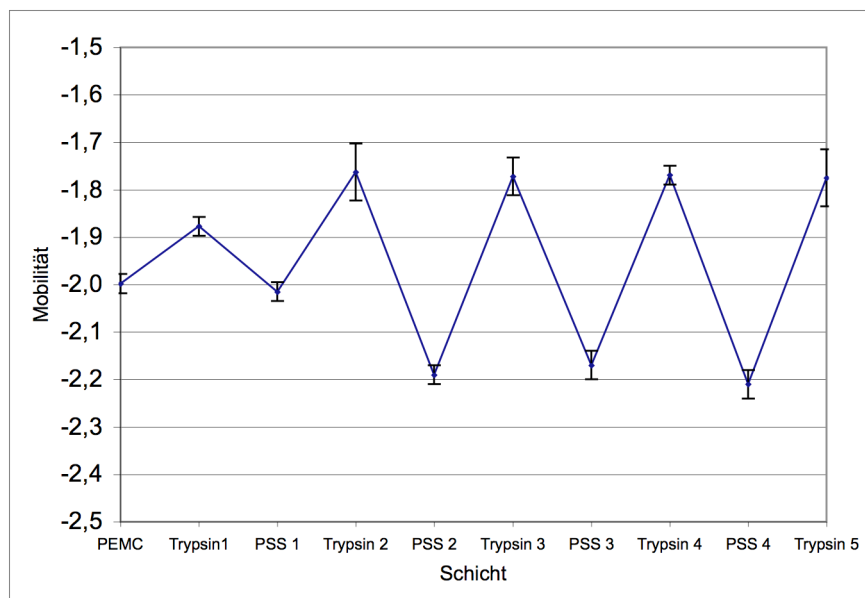
#### 4.4 Verfolgen des Schichtaufbaus mittels Zellelektrophorese

##### 4.4.1 Zellelektrophoretische Mobilität der PEMC bei Beschichtung mit PSS und Trypsin



PEMC wurden ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) nach angegebenem Protokoll (s. 4.2.2.1) mit Trypsin und PSS weiterbeschichtet. Dabei wurden PEMC mit 1 - 5 Polyelektrolyt-Paaren PSS/Trypsin hergestellt. Proben wurden von jeder Beschichtung, also jeweils nach der Trypsin Beschichtung und der darauf folgenden PSS Beschichtung, entnommen. Diese wurden nach der in 3.3.2 beschriebenen Methode zellelektrophoretisch auf ihre Mobilität im elektrischen Feld untersucht.

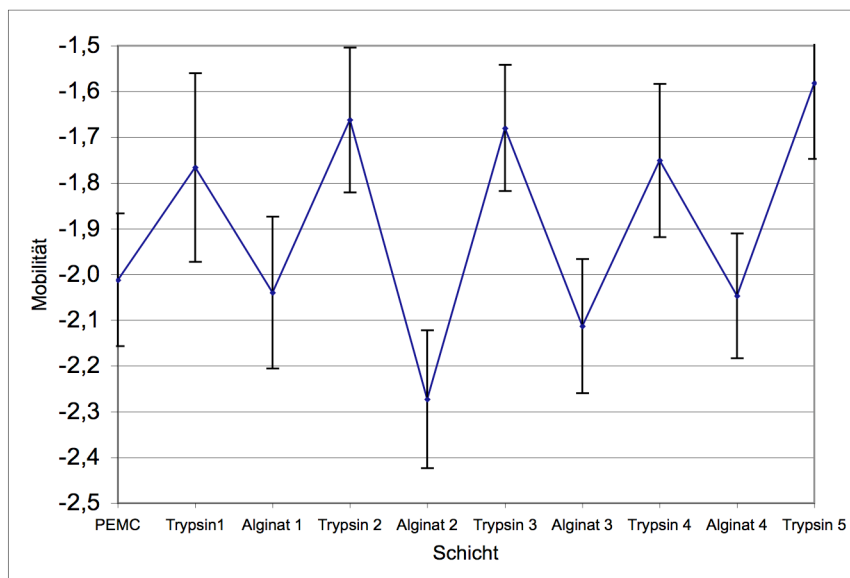
Die Mobilität der Partikel ändert sich in Abhängigkeit von der zuletzt aufgetragenen Schicht. Ausgehend von einem Mobilitätswert von  $-2,00 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei Kapseln ohne Weiterbeschichtung (Leerwert) wird die Mobilität nach Beschichtung mit Trypsin weniger negativ. Dies ist Ausdruck der eher positiven Oberflächenladung der Partikel bei Weiterbeschichtung mit Trypsin. Die Mobilität der Partikel mit einer Schicht Trypsin ist  $-1,88 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Bei Weiterbeschichtung mit der folgenden PSS-Schicht wird die Mobilität wieder mehr negativ und übersteigt die Ausgangswerte. Die Mobilität beträgt für diese Partikel  $-2,02 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die folgende Trypsin-Schicht zeigt eine weniger negative Mobilität als die erste Trypsin-Schicht. Auch die Mobilität der nächsten PSS-Schicht übersteigt die der vorherigen. Bei den folgenden Schichten spielt sich ein relativ konstantes Muster ein. Hier überschreiten die Mobilitätswerte nicht mehr diejenigen der vorigen Schichten (s. Abb. 18).



**Abb. 18: Zellelektrophoretische Mobilität von PEMC, die alternierend mit PSS und Trypsin beschichtet wurden.** Gemessen wurde in PBS bei pH 7,4. Dargestellt sind die mittleren Mobilitätswerte in  $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und deren Standardabweichung.  $n = 180$ .

#### 4.4.2 Zellelektrophoretische Mobilität bei Beschichtung mit Alginat und Trypsin

Das Vorgehen zur Präparation der PEMC für die Zellelektrophorese war analog zu dem Vorigen (s. 3.3.1), jedoch mit dem Unterschied, dass anstelle von PSS hier die polyanionische Schicht mit Alginat aufgebaut wurde. Die Beobachtungen der zellelektrophoretischen Mobilität unterscheiden sich nicht wesentlich von denen bei Beschichtung mit Trypsin und PSS. Es lässt sich auch hier nachvollziehen, dass die Amplitude der Mobilitätsunterschiede bei den ersten drei Schichten etwas geringer ist als bei den folgenden (s. Abb. 19). Weiterhin fällt auf, dass die gemessenen Mobilitätswerte insgesamt negativer sind.



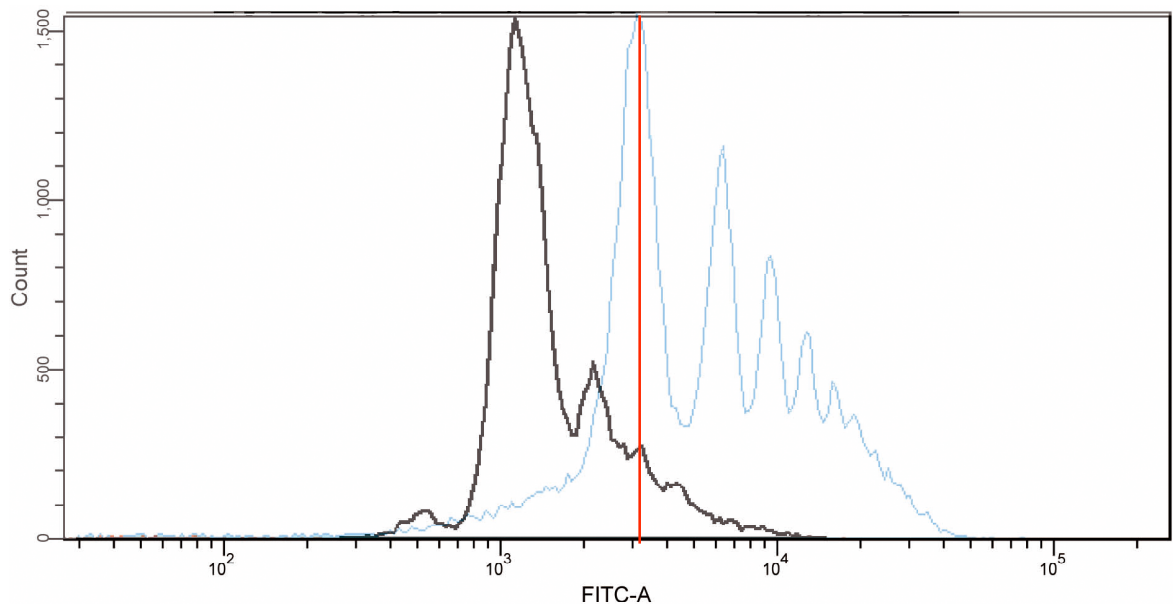
**Abb. 19: Zellelektrophoretische Mobilität von PEMC, die alternierend mit Alginat und Trypsin beschichtet wurden.** Gemessen wurde in PBS bei pH 7,4. Dargestellt sind die mittleren Mobilitätswerte in  $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und deren Standardabweichung.  $n = 180$

#### 4.5 Messung der Fluoreszenzintensität mit dem Flowzytometer

Es wurden PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) nach angegebenem Protokoll (s. 3.2.2.2) mit FITC-Trypsin und PSS (s. 3.2.1) bzw. Alginat (s. 3.2.2) weiter beschichtet. Dabei wurden PEMC mit einer bis zehn Schichten FITC-Trypsin entnommen und flowzytometrisch untersucht.

Im Scatterplot waren die Kapseln gut als Wolke zu erkennen und ließen sich eindeutig mit einem Gate umzeichnen. Die Darstellung der Partikelfluoreszenz zeigte für alle Schichten ein Histogramm mit drei bis vier deutlich abgrenzbaren Peaks.

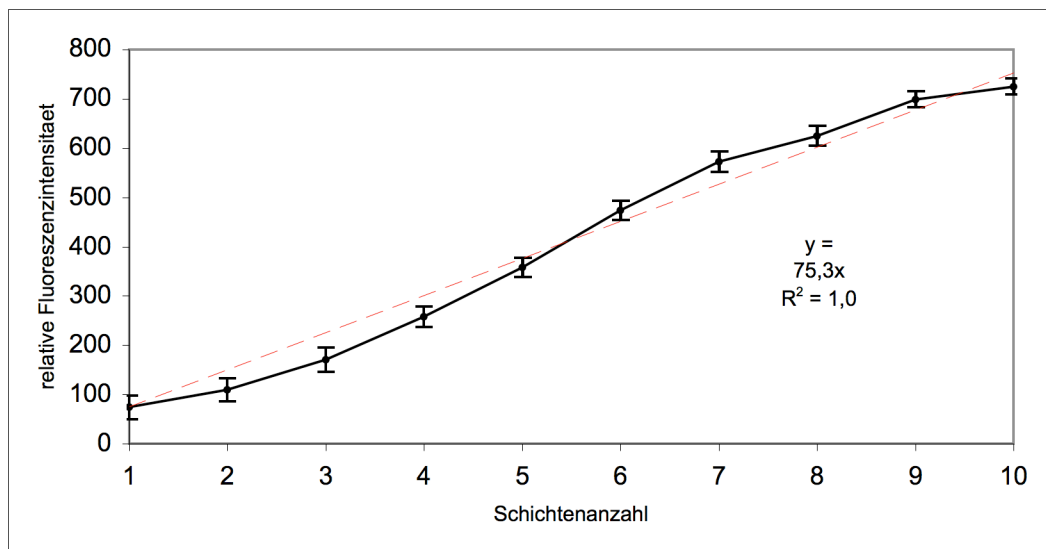
Bei der Vermessung der Peaks zeigten sich eine Verdopplung der mittleren Fluoreszenzintensität vom niedrigsten zum nächst höher gelegenen und eine Verdreifachung zum übernächsten (s. Abb. 20). Die auf den ersten folgenden Peaks sind daher als Doublets bzw. Triplets der PEMC zu deuten. Der Peak mit geringster Fluoreszenzintensität wurde auf mittlerer Fluoreszenzintensität und Standardabweichung hin vermessen und in einem Diagramm dargestellt.



**Abb. 20: Histogramm von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und Alginat beschichtet wurden.** Die graue Kurve entspricht Partikeln mit einer Schicht FITC-Trypsin. Blau sind Partikel mit 3 Schichten FITC-Trypsin dargestellt. Die rote Linie zeigt den Peak der schwarzen Kurve, der PEMC-Triplets entspricht. Dieser liegt bei der FI, die derer von einzelnen PEMC mit drei Schichten Trypsin entspricht (blaue Kurve). Aufgetragen sind die Ereignishäufigkeit (Count) und die relative Fluoreszenzintensität (FITC) der Partikel. Die Skalierung ist logarithmisch.

#### 4.5.1 Fluoreszenzintensität bei Beschichtung mit PSS und FITC-Trypsin

Die Fluoreszenzintensität wächst mit zunehmender Schichtenanzahl von FITC-Trypsin. Diese Zunahme lässt sich mit einer linearen Funktion anpassen, die in der Abbildung dargestellt ist. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) dieser Geraden ist 0,985. Allerdings verteilen sich die Messwerte nicht zufällig um die Trendlinie. Während die Werte der relativen Fluoreszenzintensität bis zu vier Schichten unter dem Trend liegen, scheint sich ab der 8. Schicht ein Plateau einzustellen (s. Abb. 21). Es handelt sich also um einen schwach sigmoidalen Kurvenverlauf.

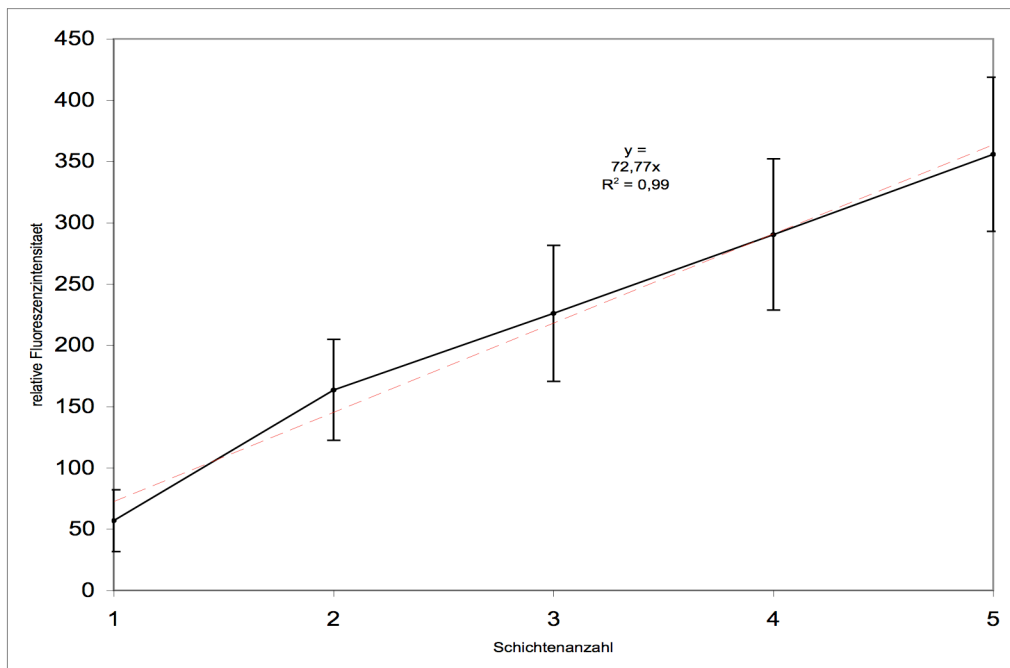


**Abb. 21: relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl** von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und PSS beschichtet wurden. Die Schichtenanzahl bezeichnet die Anzahl der FITC-Trypsin Schichten. Dargestellt sind mittlere Fluoreszenzintensitäten und deren Standardabweichung.  $n = 24.000\text{--}31.000$ . Gemessen wurde in PBS bei pH 7,4. Es ist eine lineare Trendlinie in rot dargestellt, deren Geradengleichung in der Abbildung gezeigt ist. Ihr Bestimmtheitsmaß beträgt 0,99.

#### 4.5.2 Fluoreszenzintensität bei Beschichtung mit Alginat und FITC-Trypsin

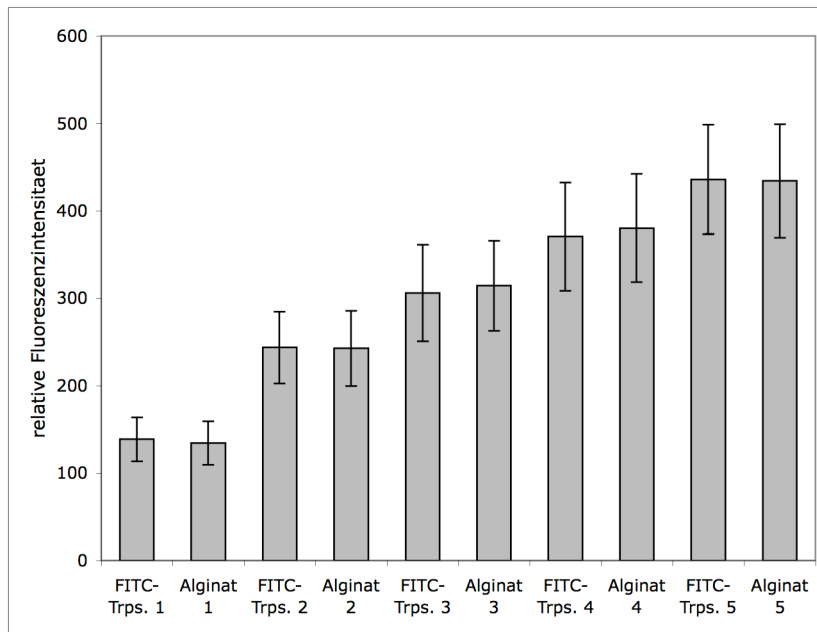
Bei der konsekutiven Beschichtung mit FITC-Trypsin und Alginat ist ebenfalls eine mit zunehmender Schichtenanzahl wachsende Fluoreszenzintensität nachweisbar. Das Bestimmtheitsmaß für die angegebene Funktion (s. Abb. 22) beträgt hier 0,99. Auch hier ist das Erreichen eines Plateaus denkbar, da der Zuwachs an Fluoreszenz von Schicht zu Schicht langsam abnimmt.

Im Vergleich zu der Beschichtung mit FITC-Trypsin und PSS fällt bei der vorliegenden Untersuchung auf, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einer etwas geringeren Steigung verläuft.



**Abb. 22: relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl** von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und Alginat beschichtet wurden. Dargestellt sind mittlere Fluoreszenzintensitäten und deren Standardabweichung.  $n = 24.000-31.000$ . Die Schichtenanzahl bezeichnet die Anzahl der FITC-Trypsin Schichten. Gemessen wurde in PBS bei pH 7,4. Es ist eine lineare Trendlinie in rot dargestellt, deren Geradengleichung in der Abbildung gezeigt ist. Ihr Bestimmtheitsmaß beträgt 0,99.

Der Einfluss des Polyanions auf die FITC-Trypsin-intensität wurde ebenfalls untersucht. Durch Aufbringen der Polyanionenschicht sollte festgestellt werden, ob ein Anteil des FITC-Trypsin der vorigen Schicht desorbiert. Die Fluoreszenzintensität von PEMC mit einer zusätzlichen Alginat-Schicht unterscheidet sich nicht signifikant von der Intensität von PEMC ohne zusätzliche Alginat-Schicht. Dies trifft auf alle 5 Schichtenpaare FITC-Trypsin/ Alginat zu (s. Abb. 23).



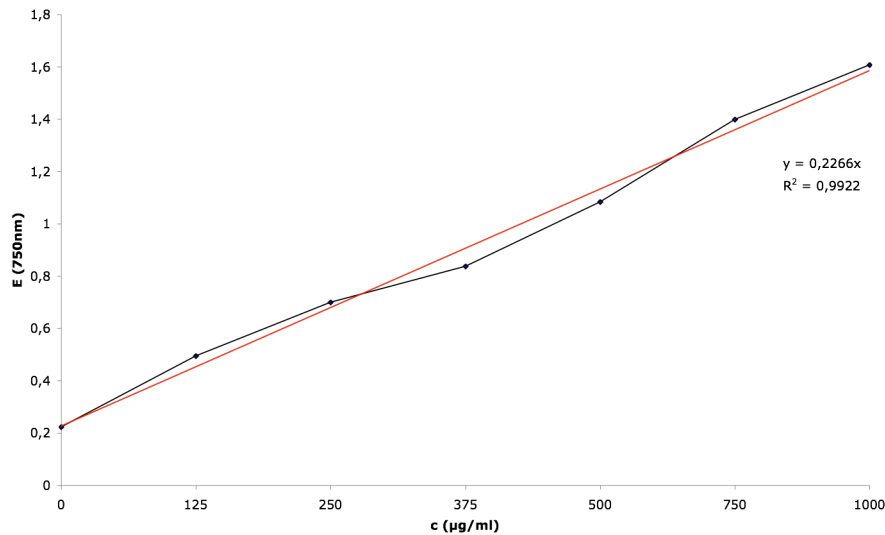
**Abb. 23: Relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl** von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und Alginate beschichtet wurden. Dargestellt sind mittlere Fluoreszenzintensitäten und deren Standardabweichung.  $n = 24.000-31.000$ . Es sind jeweils die Intensitäten aufeinander folgender Schichtenpaare FITC-Trypsin/Alginate dargestellt. Durch Aufbringen einer zusätzlichen Alginatschicht verringert sich das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den PEMC ohne zusätzliche Alginatschicht nicht. Gemessen wurde in PBS bei pH 7,4.

## 4.6 Ergebnisse photometrischer Messungen

### 4.6.1 Menge gebundenen Trypsins pro PEMC

Die Menge gebundenen Trypsins pro PEMC wurde mit der Methode nach Lowry photometrisch bestimmt.

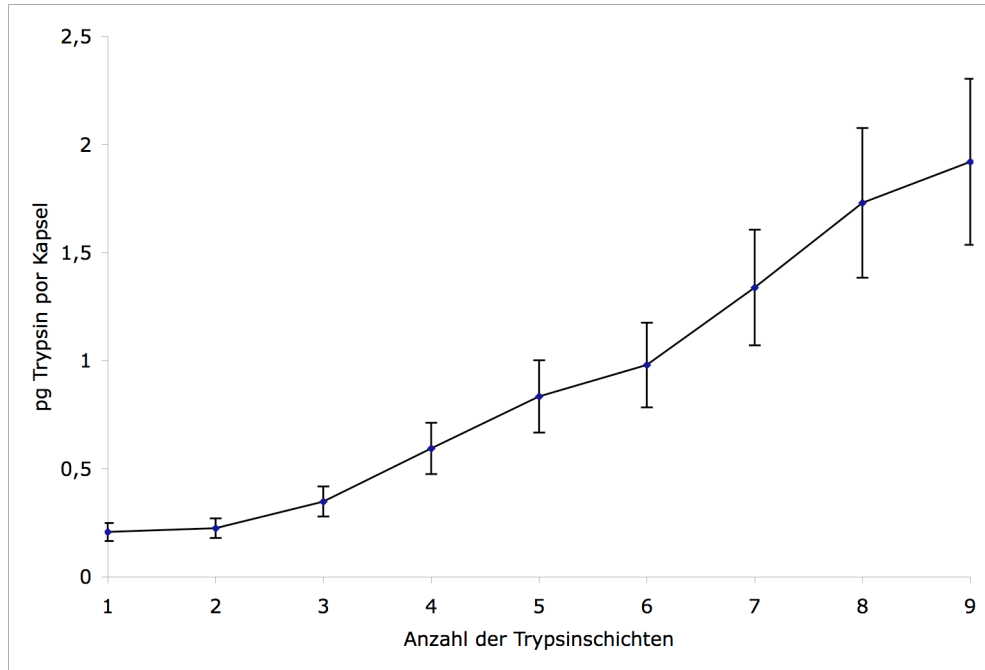
Vorbereitend wurde eine Proteinbezugskurve für Trypsin erstellt, die die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750nm in Abhängigkeit von der Trypsinkonzentration darstellt (Abb. 24). Mit Hilfe der in der Abbildung dargestellten linearen Funktion der angepassten Trendline (rot) wurden aus photometrisch bestimmten Extinktionswerten die entsprechenden Trypsinkonzentrationen berechnet.



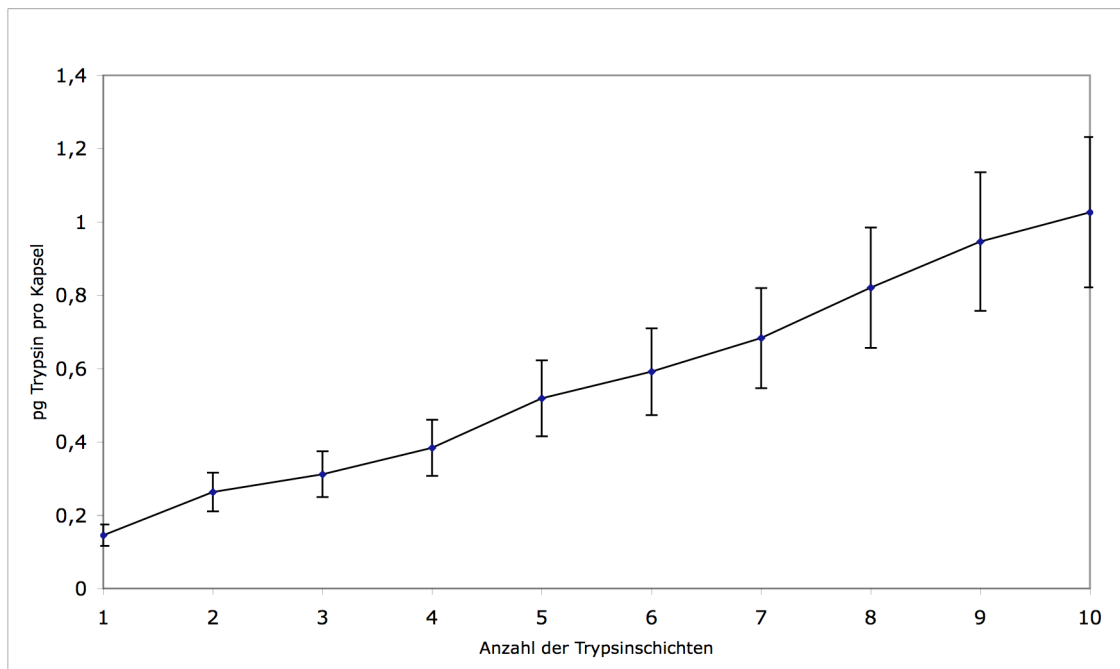
**Abb. 24: Trypsin-Standardkurve zur Errechnung von Trypsinkonzentrationen** von stark verdünnten wässrigen Lösungen aus photometrisch bestimmten Extinktionswerten unter Verwendung der Methode nach Lowry. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung.  $n = 5$ . Konzentrationsangaben in  $\mu\text{g/ml}$ . Das Bestimmtheitsmaß der dargestellten Trendlinie beträgt 0,99. Ihre Geradengleichung ist in der Abbildung angegeben.

Die PEMC wurden mit Trypsin und PSS bzw. Alginat weiterbeschichtet (s. 3.2.2.2). Dabei wurden PEMC mit einer Anzahl von ein bis zehn Schichten Trypsin aliquotiert. Die Trypsinkonzentration dieser Suspensionen wurde gemessen. Dann konnten die Zellzahlen der gemessenen Suspension bestimmt (s. 3.3.1.1.) und durch Division die Menge gebundenen Trypsins pro PEMC berechnet werden (s. Abb. 25).

Es zeigt sich eine Zunahme der Trypsinkonzentration pro PEMC mit steigender Anzahl der Trypsinschichten. Die Trypsinkonzentration steigt mit wachsender Schichtenzahl. Allerdings lässt sich keine lineare Trendlinie anpassen, da der Kurvenverlauf schwach sigmoidal ist. Die Zunahme der Trypsinkonzentration ist bei den ersten vier Schichten geringer, danach stellt sich ein annähernd lineares Wachstum ein. Erst ab der achten Schicht scheint ein Plateau angestrebt zu werden. Bei der Beschichtungsserie Trypsin/Alginat ist der Kurvenverlauf linearer. Bei Anlegen einer Trendlinie ist die Messwertverteilung jedoch ebenfalls sigmoidal. Es fällt auf, dass die Steigung der beiden Kurven sich deutlich unterscheidet. Während die Messwerte der Beschichtungsserie Trypsin/PSS bis auf 1,92  $\mu\text{g/PEMC}$  ansteigen, steigen sie im Falle der Beschichtung mit Trypsin/Alginat lediglich auf 1,03  $\mu\text{g/PEMC}$ .



**Abb. 25: Trypsinmenge in pg pro PEMC** bei Beschichtung mit Trypsin und PSS. Dargestellt sind die durch die Methode nach Lowry bestimmten Proteinkonzentrationen bezogen auf die ermittelte Zellzahl. Es resultiert die Angabe in pg pro PEMC. Angegeben sind Mittelwerte und ein Fehler von 20%. n = 2.

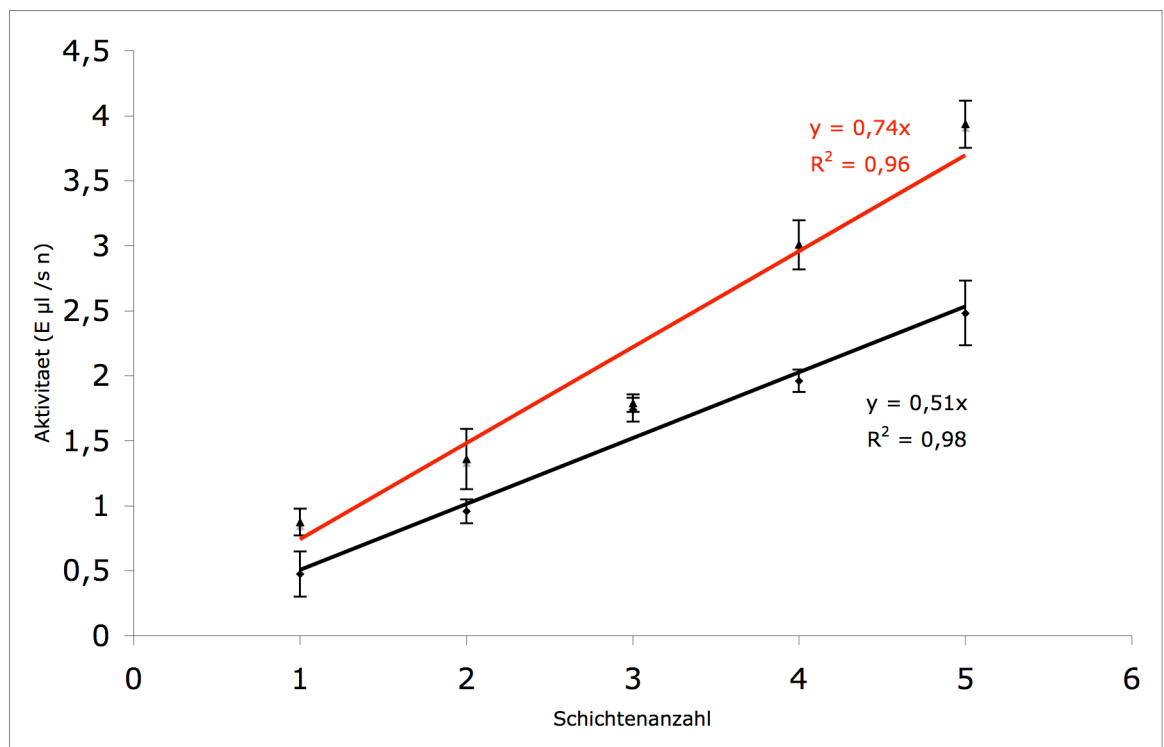


**Abb. 26: Trypsinmenge in pg pro PEMC** bei Beschichtung mit Trypsin und Alginate. Dargestellt sind die durch die Methode nach Lowry bestimmten Proteinkonzentrationen bezogen auf die ermittelte Zellzahl. Es resultiert die Angabe in pg pro PEMC. Angegeben sind Mittelwerte und ein Fehler von 20%. n = 2.



#### 4.6.2 Aktivität pro Kapsel

Die Aktivität je Kapsel konnte aus den experimentell ermittelten Daten berechnet werden (s. Abb 27). Dazu wurden PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) mit einer bis fünf Schichten der Polyelektrolytpaare PSS/Trypsin sowie Alginate/Trypsin nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt (s. 3.2.2.1). Die Aktivität und die Zellzahl der so gewonnenen PEMC-Suspensionen wurde photometrisch bzw. mikroskopisch bestimmt (s. 3.3.4.4.; 3.3.1.1). Abschließend konnte die bestimmte Aktivität ( $\Delta E/s$ ) auf die Zellzahl ( $n/\mu l$ ) bezogen werden. So erhält man die Aktivität pro einzelner Kapsel ( $\Delta E \mu l / s n$ ). Man erkennt, dass die Aktivität pro PEMC linear mit wachsender Zahl Trypsin-Schichten zunimmt. Die Aktivitätszunahme je Schicht beträgt  $0,74 \Delta E \mu l / s n$  für die Beschichtung mit Trypsin/PSS bzw.  $0,51 \Delta E \mu l / s n$  für die Beschichtungsserie Trypsin/Alginate.



**Abb. 27: Aktivität bezogen auf einzelne PEMC.** Die Zahlwerte der Abszisse entsprechen der Anzahl der Trypsin-Schichten der jeweiligen PEMC. Auf der Ordinate ist die Aktivität bezogen auf eine einzelne PEMC dargestellt ( $\Delta E \mu l / s n \cdot 10^9$ ). Schwarz = Beschichtungsserie mit Alginate/Trypsin, rot = PSS/Trypsin dargestellt. Gleichfarbig zu den Messwerten wurden lineare Trendlinien angepasst, deren Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß in der Abbildung angegeben sind. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichungen.  $n=3$

#### 4.6.3 Aktivität des immobilisierten Enzyms bezogen auf die gemessene Enzymkonzentration

Ziel dieses Experiments war, die durch den photometrischen Test nach Lowry bestimmten Trypsinkonzentrationen von PEMC-Suspensionen mit den Messwerten der photometrischen Messung der Enzymkinetik zu korrelieren. So sollte ermittelt werden, ob sich die Aktivität des an die Kapseln gebundenen Trypsins -unabhängig von der Menge pro Kapsel - in Abhängigkeit von dem eingesetzten Polyelektrolyten oder der Schichtenanzahl unterscheidet. Verglichen wurden zwei Beschichtungssequenzen für PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS). Die eine bestand in einer Beschichtung mit Trypsin und Alginat, die andere in einer konsekutiven Beschichtung mit Trypsin und PSS.

Ist die zuletzt aufgebrauchte Schicht Trypsin, dann ist die relative Trypsinaktivität um den Faktor 2-3 höher als bei den PEMC, bei denen die äußere Schicht aus einem Polyelektrolyt besteht. Die Aktivitätswerte für die polyelektrolytbeschichteten PEMC unterscheiden sich unabhängig von der Anzahl darunter liegender Trypsin-Schichten nicht signifikant voneinander. Weiterhin zeigen sich keine Unterschiede zwischen der Beschichtung mit Trypsin/PSS und der mit Trypsin/Alginat. Diese Schichten ergeben Aktivitätswerte zwischen 0,98 und 1,2 ( $\Delta E \text{ ml} / \text{s } \mu\text{g} \times 10^6$ ), die sich im Rahmen der gegebenen Messgenauigkeit nicht voneinander abgrenzen lassen.

Nach dem Aufbringen der 1. Trypsinschicht (Trypsin 1) weisen die PEMC mittlere Werte von 3,7 ( $\Delta E \text{ ml} / \text{s } \mu\text{g} \times 10^6$ ) auf. Die nachfolgende Beschichtung mit dem PE führt zu einer Reduktion der Trypsinaktivität. Die erneute Beschichtung der PEMC mit Trypsin (Trypsin 2) resultiert in einer um 23% niedrigeren Aktivität im Vergleich zur ersten Enzymschicht (Trypsin 1). Die dritte Trypsinschicht bewirkt nur noch eine um 12% niedrigere Aktivität von 2,5 ( $\Delta E \text{ ml} / \text{s } \mu\text{g} \times 10^6$ ). Dieser Unterschied ist jedoch im Rahmen des angegebenen Fehlers nicht signifikant. Die weiteren Schichten (Trypsin 4 und 5) zeigen eine Aktivität von 2,3 ( $\Delta E \text{ ml} / \text{s } \mu\text{g} \times 10^6$ ). Diese Werte lassen sich weder voneinander noch von denen für drei Schichten Trypsin unterscheiden.

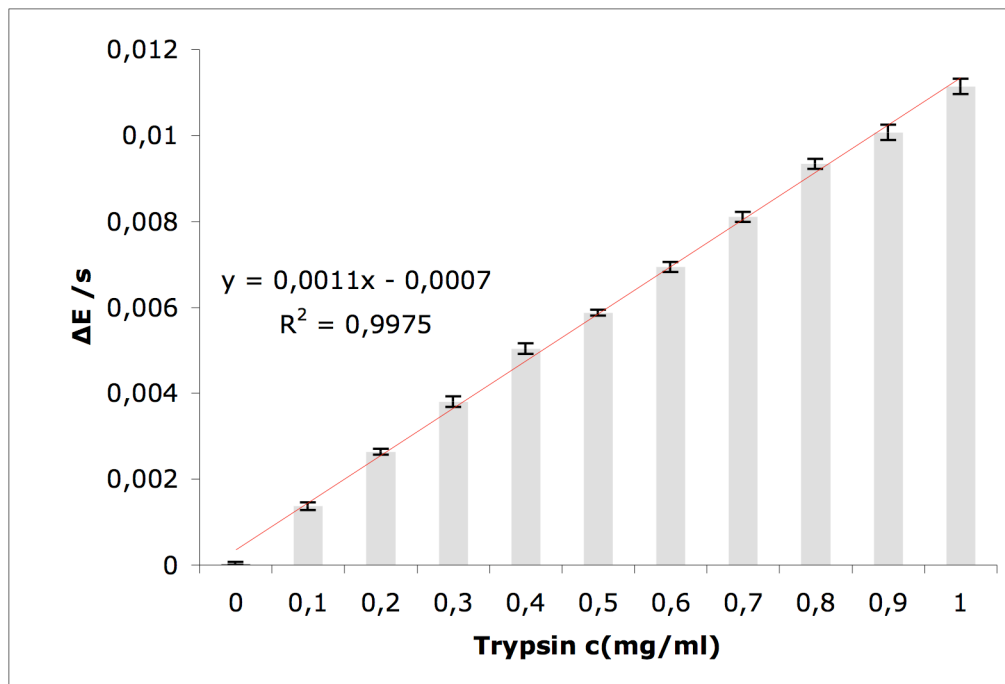
Die Aktivitätswerte für die Beschichtungsserie Trypsin/PSS lassen sich nicht signifikant von denen der Beschichtungsserie Trypsin/Alginat unterscheiden.

	Trypsin/Alginat	SD	Trypsin/PSS	SD
Trypsin 1	3,69449367	0,463	3,063250113	0,314
Polyelektrolyt 1	1,200385365	0,101	1,108160192	0,111
Trypsin 2	2,862378211	0,067	2,78407014	0,06
Polyelektrolyt 2	1,050273599	0,066	0,977183841	0,062
Trypsin 3	2,506638094	0,072	2,565108517	0,141
Polyelektrolyt 3	0,991876825	0,052	1,107283266	0,058
Trypsin 4	2,32803848	0,102	2,420063715	0,130
Polyelektrolyt 4	1,078607987	0,132	1,046009417	0,118
Trypsin 5	2,270454252	0,140	2,469132536	0,112

**Abb. 28: Aktivität von mit Trypsin beschichteten PEMC bezogen auf die photometrisch bestimmte Trypsinkonzentration (Lowry).** Angegeben sind Mittelwerte der Aktivität und die Standardabweichung. n=3. Werte in ( $\Delta E \text{ ml} / \text{s } \mu\text{g} \times 10^6$ ).

#### 4.6.4 Vergleich der Aktivitäten von an PEMC immobilisiertem und freiem Enzym

Die Aktivität des an den PEMC immobilisierten Enzyms soll mit der Aktivität von freiem Trypsin, das in TRIS-Puffer gelöst wurde, verglichen werden. Dazu wurde eine aufsteigende Reihe Trypsinlösungen in TRIS-Puffer nach dem beschriebenen Verfahren (s. 3.3.4.4) photokinetisch untersucht. Angefangen bei einem Leerwert wurden Trypsinkonzentrationen bis zu einer Höchstkonzentration von 1 mg/ml in Abständen von 0,1 mg/ml untersucht. In diesem Bereich bewegen sich auch die photometrisch bestimmten Enzymkonzentrationen der PEMC-Suspensionen. Es zeigte sich im untersuchten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen der Enzymaktivität und der Trypsinkonzentration (s. Abb. 29).

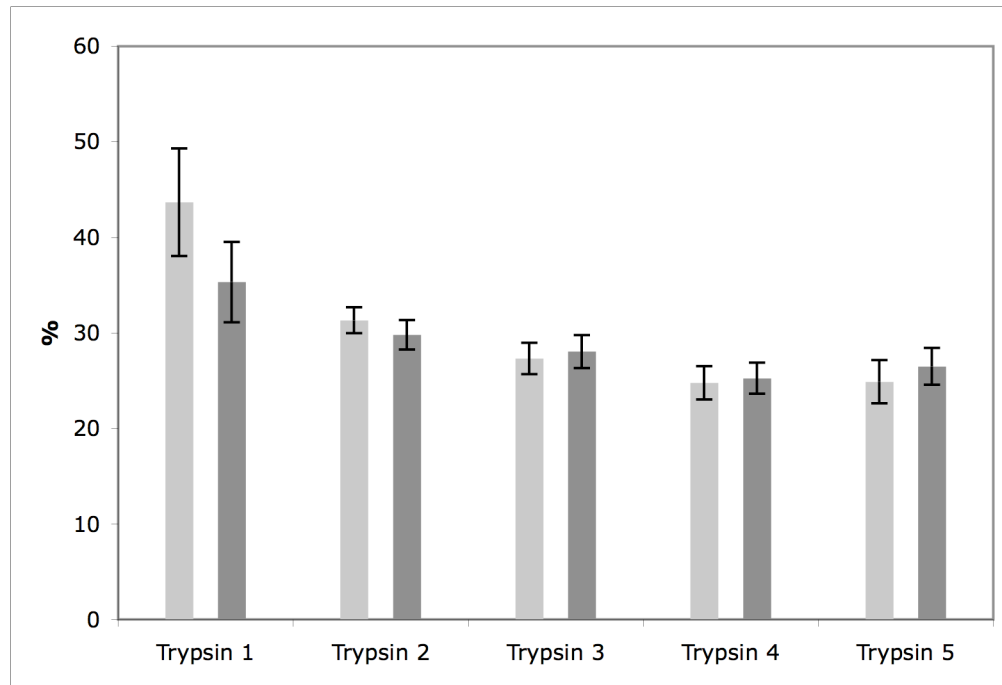


**Abb. 29: Aktivität von Trypsinlösungen in Tris-Puffer (pH 7,4) bei unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen.** Konzentrationsangaben in mg/ml. Die Aktivität ist als Extinktionsänderung pro Sekunde dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und die Standardabweichung ( $\Delta E/s$ ).  $n = 3$

Es wurden Suspensionen aus PEMC und Tris-Puffer bei pH 7,4 hergestellt und deren Kapseln mit Trypsin und Alginat bzw. PSS beschichtet. Von diesen Suspensionen wurde der Trypsingehalt ( $T_C$ ) und die Aktivität ( $\Delta E$ ) bestimmt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde  $\Delta E$  auf 1 normiert. Die normierte Aktivität  $\Delta E/T_C$  ergibt im Vergleich mit der normierten Aktivität des freien Trypsins (Kalibrationskurve) ein Maß für die Aktivität des Trypsins nach dem Einbau in die PEMC. So gelingt es, anzugeben, wie hoch die verbleibende Aktivität nach Immobilisierung ist.

Anders ausgedrückt gibt dieser Wert der verbleibenden Restaktivität an, wie viel des tatsächlich an der PEMC immobilisierten Trypsins aktiv ist. In der Abbildung 30 ist dieser Vergleich dargestellt. Aufgetragen ist die Aktivität des immobilisierten Enzyms in % gegenüber der Aktivität freien Enzyms gleicher Konzentration. Die Werte bewegen sich für die Proben, bei denen die abschließende Schicht Trypsin ist, zwischen 43 und 24%. PEMC, die mit nur einer Schicht Trypsin beschichtet sind, zeigen eine anteilige Aktivität von gemittelten 39%. Die folgende Trypsin Schicht zeigt einen Abfall um fast 10% auf 31%. Von der zweiten zur dritten und

von dieser zur vierten und fünften Trypsinschicht ist keine weitere Minderung der Aktivität im Rahmen des angegebenen Fehlers nachzuweisen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Beschichtungsserien mit Alginat und Trypsin und denen mit PSS und Trypsin.



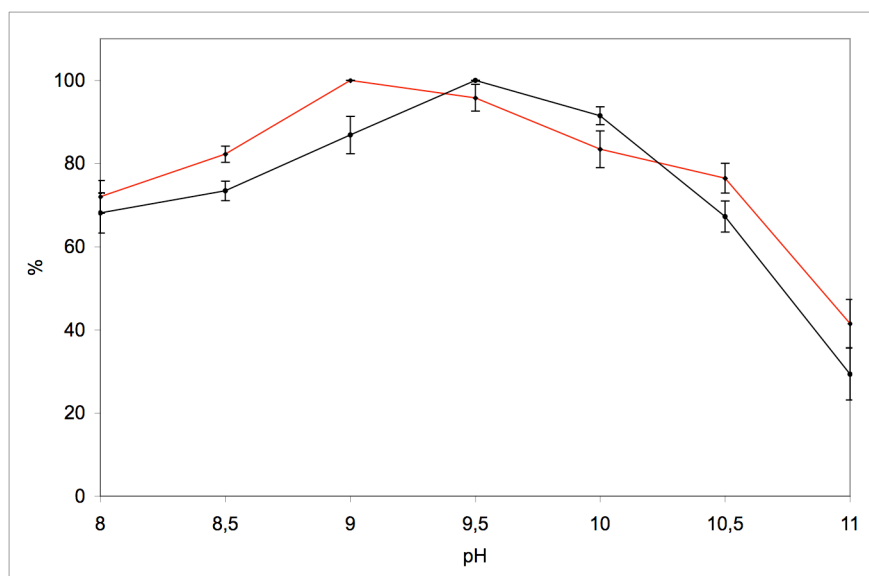
**Abb. 30: Darstellung der verbleibenden Aktivität des an PEMC immobilisierten Trypsins** für verschiedene aufeinander folgende PEMC Beschichtungen. Dargestellt ist die verbleibende Restaktivität des an die PEMC gebundenen Trypsins in %. Als Bezug diente Trypsin, dass in Tris-Puffer bei pH7,4 untersucht wurde (s. 3.6.2). Gezeigt sind Mittelwerte und der Fehlerbereich einer Standardabweichung. Hell ist die Beschichtungsserie mit Alginat und Trypsin, dunkel die mit PSS und Trypsin dargestellt. n=3

#### 4.6.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität des freien und immobilisierten Enzyms

BAPA-Stammlösungen unterschiedlicher pH-Werte wurden mit einem Borat-Puffersystem hergestellt und für Aktivitätsmessungen verwendet. Weiterhin wurden Trypsinlösungen in destilliertem Wasser verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den PEMC-Suspensionen zu gewährleisten. Ziel war, die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit vom pH-Wert zu untersuchen. Gegebenenfalls sollten Unterschiede zwischen freiem und immobilisiertem Enzym herausgefunden werden. Die Durchführung der Aktivitätsmessungen erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll (s. 3.3.4.4). Zuvor musste sichergestellt werden, dass sich der pH-Wert der jeweiligen BAPA-Stammlösung durch Zugabe der Enzymlösung beziehungsweise der PEMC-Suspension nicht ändert, die

Pufferkapazität also ausreichend ist. Immobilisiert wurde das Enzym durch Beschichtung von PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS), indem eine Schicht Trypsin nach angegebenem Protokoll (s. 3.2.2.1) aufgebracht und viermal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde.

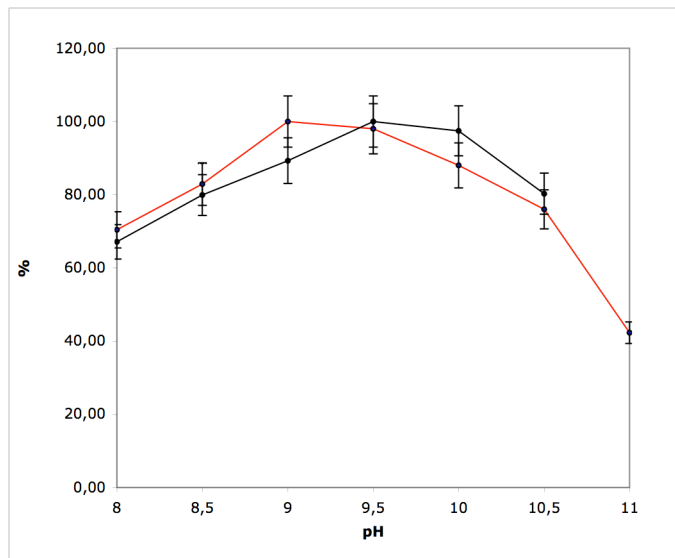
Dargestellt wurden die Aktivitäten der Maximalaktivität in Prozent. Die Aktivität des freien Enzyms beträgt bei pH 8 70% und steigt auf über 80% bei pH 8,5. Sie erreicht ein Maximum bei pH 9. Anschliessend sinkt die Aktivität bis pH 11 kontinuierlich, bis sie etwa 40% erreicht hat. Das an PEMC immobilisierte Enzym zeigt einen sehr ähnlichen Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert. Sie ist allerdings in Richtung höherer pH-Werte verschoben und zeigt eine maximale Aktivität bei pH 9,5 (s. Abb. 31).



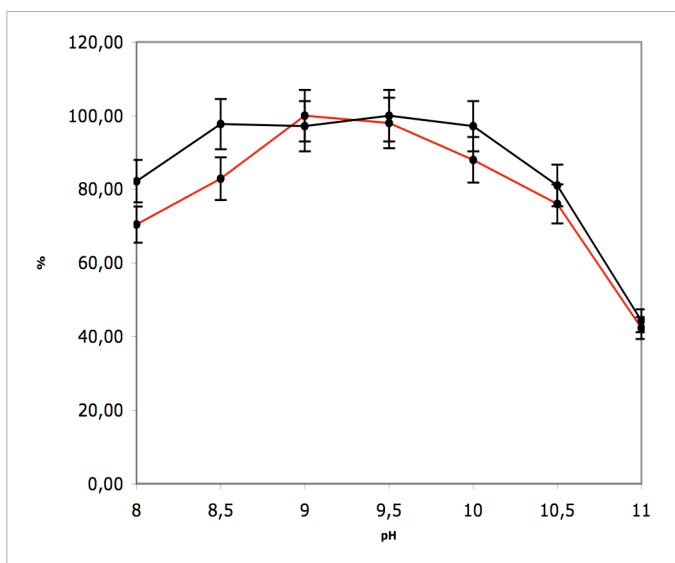
**Abb. 31: Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes.** Rot dargestellt sind Trypsin-Lösungen in destilliertem Wasser (0,5 mg/ml). Schwarz ist die Aktivität von PEMC-Suspensionen ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS-Trypsin) in destilliertem Wasser dargestellt. Bestimmt wurde die Aktivität als  $\Delta E/s$ . Die höchste Aktivität einer Gruppe wurde als 100% definiert und alle anderen daran gemessen. Die Puffer sind Borat-Puffer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=5

In einem weiterführenden Experiment wurde das Enzym immobilisiert, indem PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) alternierend mit Trypsin und PSS bzw. Alginat beschichtet wurden, und zwar jeweils mit drei Schichten (Trypsin-Polyelektrolyt-Trypsin). Ziel dieser Versuchsreihe war, zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Polyelektrolyte ebenfalls einen Einfluss auf das pH-Wert abhängige Aktivitätsprofil haben. Das Ergebnis ist dem vorigen Experiment ähnlich. Auch hier findet sich die

höchste beobachtete Aktivität beider Polyelektrolytbeschichtungen bei einem um 0,5 Einheiten höheren pH als bei der Untersuchung des Enzyms in wässrigen Lösungen (s. Abb. 32).



**Abb. 32: Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes.** Rot dargestellt sind Trypsin-Lösungen in destilliertem Wasser (0,5 mg/ml). Schwarz dargestellt ist die Aktivität von PEMC, die mit **Trypsin und Alginat** ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS-Trypsin-PSS-Trypsin) beschichtet wurden. Bestimmt wurde die Aktivität als  $\Delta E/s$ . Die höchste Aktivität einer Reihe wurde als 100% definiert und alle anderen daran gemessen. Als Puffer wurde ein Borat-Puffer-System verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=5



**Abb. 33: Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes.** Rot dargestellt sind Trypsin-Lösungen in destilliertem Wasser (0,5 mg/ml). Schwarz dargestellt ist die Aktivität von PEMC, die mit **Trypsin und PSS** ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS-Trypsin-Alginat-Trypsin) beschichtet wurden. Bestimmt wurde die Aktivität als  $\Delta E/s$ . Die höchste Aktivität einer Gruppe wurde als 100% definiert und alle anderen daran gemessen. Es wurde Borat-Puffer verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n=5

## 5 Diskussion

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die verwendeten PEMC nach dem Layer-by-Layer Prinzip mit Trypsin beschichtet werden können. Dabei entstehen aufeinander aufbauende Schichten. Diese Beschichtung gelingt mit den zum Trypsin komplementären Polyelektrolyten PSS und Alginat. Die Aktivität des an der PEMC-Membran immobilisierten Enzyms bleibt erhalten, sinkt jedoch auf etwa 25% der Aktivität freien Enzyms gleicher Konzentration. Das pH-Optimum des immobilisierten Enzyms verschiebt sich im Vergleich zum freien Enzym in basische Richtung. Im Falle einer Beschichtung mit dem PE-Paar Trypsin/PSS wird mehr Trypsin pro PEMC immobilisiert, als bei der Beschichtung mit Trypsin/Alginat. Allerdings wird eine Hemmung des Enzyms durch PSS beobachtet. Der Einfluss dieser Hemmung wird diskutiert.

### 5.1 Layer-by-Layer Adsorption von Trypsin

Ziel dieses Versuches war einerseits, die notwendige Anzahl von Waschvorgängen bei der Weiterbeschichtung von PEMC (s. 3.2.2) festzulegen. Andererseits sollte sicher gestellt sein, dass in den hergestellten PEMC-Suspensionen kein freies, also nicht an PEMC gebundenes Trypsin vorliegt. Freies Trypsin in den Suspensionen würde zu falschen (zu hohen) Ergebnissen der Untersuchungen zur gebundenen Trypsinmenge pro PEMC führen, ebenso bei der Bestimmung der Aktivität des gebundenen Enzyms. Während der Weiterbeschichtung soll kein freies Trypsin in den Suspensionen vorliegen, wenn mit einem Polyelektrolyten beschichtet wird, da dieses die Adsorption des Polyanions stören könnte, indem es mit diesem Komplexe bildet und damit die Menge des zur Verfügung stehenden Polyanions vermindert.

Darüber hinaus ist von Komplexbildung zwischen Trypsin und den Polyelektrolyten auszugehen, die unabhängig von der Interaktion des Trypsins mit der PEMC-Membran ist. So ist es denkbar, dass solche Trypsin/PE-Komplexe sich in der Matrix der Membran verfangen. In diesem Falle wäre ein Teil des Enzyms zwar in der Membran immobilisiert, nicht jedoch nach dem hier untersuchten Layer-by-Layer Prinzip [22].



Die Trypsinkonzentration in den Überständen aufeinander folgender Waschvorgänge nimmt ab (s. 4.1). Die Standardabweichung des ersten Waschvorgangs ist mit etwa 50% des Mittelwertes recht groß. Die grosse Variabilität ist damit zu erklären, dass beim Absaugen der für die Inkubation eingesetzten Trypsinlösung streng darauf geachtet wurde, möglichst keine PEMC mit abzusaugen. Bei unterschiedlicher Konfiguration des Pellets wird daher nicht die gesamte Lösung abgesaugt, und in Folge variiert die Menge der verbleibenden Trypsinlösung unter Umständen auch beachtlich. Bei nachfolgenden Waschungen wird die Variabilität geringer. Die Messwerte für freies Trypsin im Überstand liegen bei einer Standardabweichung von 0,01 mg/ml, die der dritten und vierten Waschprozeduren unterhalb der Nachweisgrenze. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass keine relevante Enzymkonzentration mehr in einer PEMC Suspension enthalten ist, wenn diese dreimal mit Wasser gewaschen wurde.

## **5.2 Einfluss unterschiedlicher Polyanionen auf die Enzymaktivität**

Die Adsorptionsvorgänge an der Membran der PEMC beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Trypsin und dem jeweiligen Polyanionmolekül. Diese Wechselwirkungen sind vorrangig elektrostatischer Natur [47, 48, 52, 59]. Es wurden weiterhin Komplexbildungen zwischen beiden Polyelektrolyten beschrieben [48, 52, 53]. Um zu untersuchen, ob diese Wechselwirkungen zwischen PE und dem Trypsin auch ohne die Adsorption an einer PE-Membran einen relevanten Einfluss auf die Enzymaktivität haben, wurde der vorliegende Versuch durchgeführt (s. 4.2).

Die Zugabe von PSS zu Trypsinlösungen (s. 4.2.1) führte zunächst zu einer Verminderung der Enzymaktivität um maximal 41%, verglichen mit der Aktivität entsprechender Trypsinlösungen ohne Zugabe von PSS. Die Lösungen zeigten eine sichtbare Trübung, die auf eine Komplexbildung hinweist. Da es mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht gelingt, die PSS-Konzentration in wässrigen Lösungen zu quantifizieren, kann man nicht sicher sagen, wie viel PSS an den PEMC adsorbiert. Die Trypsinkonzentration von PEMC-Suspensionen liegt in der Größenordnung von 0,05-0,1 mg/ml. Geht man davon aus, dass die PSS-Konzentration etwa gleich hoch ist, entspräche dies einer Hemmung der Trypsinkonzentration um etwa 20% der Konfiguration, die in PEMC-Suspensionen

vorliegt.

Mischungen von Trypsin und Dextransulphat (s. 4.2.3) zeigen ebenfalls eine mit zunehmender Konzentration von Dextransulphat abnehmende Enzymaktivität. Die Minderung der Aktivität ist allerdings mit 28% geringer als bei Zugabe von PSS. Bei Lösungen, die Trypsin und Alginat enthalten, lässt sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine Abnahme der Enzymaktivität mit zunehmender Alginatkonzentration nachweisen. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Patil et al., die bei Einkapselung von Trypsinkristallen keine Aktivitätsminderung feststellen konnten, die durch das verwendete Alginat verursacht sein könnte. Die dort festgestellte Aktivitätsminderung konnte auf die verminderte Diffusion von Substrat und Produkt durch die Kapselwand zurückgeführt werden. Nach Auflösen der Kapseln stieg die Aktivität des Trypsins wieder auf normale Werte an [65]. Jain et al. haben Trypsin an Alginat nichtkovalent immobilisiert und beschreiben eine Aktivität des immobilisierten Enzyms von 100% [42].

Da sowohl Dextransulphat, als auch PSS Sulphatgruppen enthält, könnte diese gemeinsame Eigenschaft, in der sich die beiden Polyelektrolyte vom Alginat unterscheiden, die Enzymhemmung verursachen. Eigene Versuche, bei denen die Enzymaktivität in Trypsinlösungen mit aufsteigenden Konzentrationen von Magnesiumsulphat untersucht wurde, zeigten keine Hemmung des Trypsins durch Magnesiumsulphat im untersuchten Konzentrationsbereich. Untersucht wurden Konzentrationen bis 100mg/ml. Diese Konzentration ist um den Faktor 100 größer, als die Konzentration der PE-Lösungen, die für die Beschichtungen benutzt wurden. Fuentes et al. berichten von Experimenten mit Dextransulphat als Ionenaustauschharz. Diese zeigen eine starke und leicht reversible Bindung von Trypsin an das  $\text{DxSO}_4$ , wobei keine Aktivitätsminderung beobachtet wurde [30]. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Aktivitätsminderung der mit Trypsin/ $\text{DxSO}_4$  beschichteten PEMC nicht durch die Trypsin/ $\text{DxSO}_4$ -Bindung verursacht wird.

Suzuki et al. haben gezeigt, dass Trypsin durch Sulphoglycolipid Devirate gehemmt wird [86], und Ito et al. haben beobachtet, dass sulphatierte Lipide ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Trypsin haben [41]. Ito postuliert für die Hemmung von Trypsin eine Sulphatgruppe in einem linearen Molekül und einem zusätzlichen hydrophoben Gegenpol. In beiden angeführten Beispielen handelt es sich um lineare Moleküle, die aus der linearen Struktur herausragende

Sulphatgruppen tragen. Diese Eigenschaft teilen sie mit den Polyelektrolytmolekülen PSS und Dextransulphat. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Sulphatgruppen in den PE-Molekülen tatsächlich die Hemmung des Enzyms vermitteln, allerdings scheint ein hydrophober Gegenpol nicht unbedingt erforderlich zu sein, da die Hemmung auch durch PSS und Dextransulphat gelingt (obwohl beide Moleküle keine hydrophoben Gruppen tragen).

Diese Ergebnisse lassen dennoch erwarten, dass die Enzymaktivität von Trypsin, das an PEMC immobilisiert wurde, im Falle einer Beschichtung mit Trypsin/PSS durch die gezeigte Interaktion geringer sein könnte, als im Falle einer Beschichtung mit Trypsin und Alginat. Wie groß dieser Einfluss ist, soll in weiteren Untersuchungen betrachtet werden (s. 5.7).

### **5.3 Untersuchung der Oberflächenladungen bei der Layer-by-Layer Beschichtung**

Die Ergebnisse der zellelektrophoretischen Messungen zeigen Änderungen der elektrophoretischen Mobilität (EPM) von PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) bei der Weiterbeschichtung mit den Polyelektrolytpaaren PSS/Trypsin und Alginat/Trypsin. Die nativen PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) haben negative Mobilitätswerte. Das bedeutet, dass ihre Oberflächenladung negativ ist. Diese negative Oberflächenladung ist Voraussetzung für die Beschichtung mit positiven Polyelektrolytmolekülen [22]. Der Mobilitätswert von etwa  $-2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entspricht dem anderer Untersuchungen [6, 97].

Nach Weiterbeschichtung der Partikel mit dem bei pH 7,4 positiv geladenen Trypsin [80] zeigt sich eine Abnahme der negativen Mobilität. Diese Änderung der Mobilität ist Ausdruck der weniger negativen Oberflächenladung der PEMC nach Weiterbeschichtung, da die negativen Ladungen der PEMC durch die positiven Ladungen des Trypsins kompensiert werden. Bei weiterer Beschichtung mit einem Polyanion, also PSS oder Alginat, werden die Mobilitätswerte der PEMC wieder negativer. Dies kann als Ausdruck der Adsorption des Polyanions an die PEMC-Membran gewertet werden [8, 26, 38].

In anderen Arbeiten wurde bei der Beschichtung von Erythrozyten mit Polyelektrolyten nach Aufbringen der kationischen Schicht sogar eine Umkehr

der Oberflächenladung gemessen [46, 56]. Allerdings wurde in diesem Fall nicht mit Trypsin, sondern mit PSS/PAH weiterbeschichtet. Die im vorliegenden Experiment gemessenen Ladungsunterschiede sind im Vergleich relativ gering. Dieser Unterschied begründet sich zum Teil durch die geringer ausgeprägten Ladungsunterschiede zwischen Trypsin und PSS im Vergleich zum Ladungsunterschied zwischen PSS und PAH. Darüber hinaus wurde in den zum Vergleich stehenden Arbeiten mit höheren Ionenstärken der Messlösungen gearbeitet.

Für die ersten drei Schichten sind die zellelektrophoretischen Mobilitätsunterschiede etwas geringer als für die folgenden sieben. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Arbeiten gemacht [16, 72, 75].

Die Ergebnisse zeigen eine Änderung der Oberflächenladung bei der konsekutiven Weiterbeschichtung von PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) mit Trypsin und PSS oder Alginat. Sie zeigen jedoch nicht, ob die adsorbierten Moleküle Schichten ergeben, die aufeinander aufbauen. Angenommen, eine Polyelektrolytschicht würde die vorher aufgebrauchte Trypsinschicht wieder von der PEMC lösen, würden sich die Ergebnisse nicht zwingend von den vorliegenden unterscheiden. Nach der initialen Beschichtung mit Trypsin wird die Mobilität weniger negativ werden. Würde die folgende PE-Schicht das adsorbierte Trypsin durch Wechselwirkung, zum Beispiel durch Komplexbildung, desorbieren lassen, würde die Mobilität wieder negativer.

#### **5.4 Untersuchungen mittels CLSM**

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (s. 4.3) von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und PSS beschichtet wurden, zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal an der Kapselmembran. Die Intensität dieser Randfluoreszenz nimmt mit steigender Anzahl Trypsin-Schichten zu. Dieser Befund stützt die Annahme, dass die angewandte Beschichtungsmethode zu einem konsekutiven Aufbau von Schichtpaaren aus FITC-Trypsin und PSS bzw. Alginat führt.

Das Fluoreszenzsignal im Inneren der Kapsel ist stärker als das Hintergrundsignal. Diese Beobachtung kann unterschiedlich interpretiert werden. Einerseits ist denkbar, dass das Enzym nicht ausschließlich an der Membran adsorbiert,

sondern auch in das Kapselinnere diffundiert. Andererseits kann das Binnensignal auch durch ein Überstrahlungsphänomen entstehen. Das konfokale Prinzip (s. 2.4.1) ermöglicht die Akquise von Bildpunkten aus nur einer Ebene, also auch die Darstellung von Schnittbildern durch einzelne Zellen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass ein Fluoreszenzsignal aus überlagernden oder tiefer liegenden Schichten in der Lage ist, in die jeweils untersuchte Schicht einzustrahlen. Diese Erklärung ist umso wahrscheinlicher, als das Fluoreszenzsignal im Inneren der PEMC nicht homogen scheint, sondern zur Mitte des Partikels hin schwächer wird. Unter Annahme dieses Überstrahlungsphänomens würde sich der vorliegende Befund dadurch erklären, dass bei einem runden Partikel die überstrahlenden Schichten, also die Kapselmembran, bei einem Schnitt durch die Mitte des Partikels weiter von der konfokalen Ebene entfernt sind, als bei randnahen Schichten. Im umgekehrten Falle, wenn also das FITC-markierte Trypsin im Inneren der PEMC lokalisiert wäre, würde man davon ausgehen, dass die Fluoreszenzintensität zur Mitte des Partikels zunehmen würde.

#### **5.5 Durchflusszytometrische (FACS) Untersuchungen zur Layer-by-Layer Beschichtung der Polyelektrolytmikrokapseln**

Der Beweis des Schichtaufbaus im Sinne der Layer-by-Layer Theorie gelingt erst durch direkte oder indirekte Quantifizierung des aufgetragenen Trypsins pro PEMC mittels Flowzytometrie und photometrischer Proteinbestimmung.

In Übereinstimmung mit den Messungen der zellelektrophoretischen Mobilität wurde bei den FACS-Messungen ein geringerer Zuwachs der Fluoreszenzintensität für die ersten Schichten gefunden (s. 4.5). Daraus lässt sich ableiten, dass die ersten zwei bis vier Schichten weniger Enzym binden als die folgenden. Decher hat entsprechende Beobachtungen bei der Messung der Dicke von Polyelektrolytmembranen gemacht, wenn die verwendeten Polyelektrolyte, wie in diesem Fall, relativ schwach geladen sind [22, 66]. Dort wird erklärt, dass sich die erste Polyelektrolytschicht nur mit einigen ihrer Ladungen an die Oberfläche der PEMC bindet und einen Grossteil ihrer Ladungen zentrifugal nach der Umgebungslösung hin ableitet. Dieser Mechanismus wird effektive Multiplikation der Oberflächenfunktionalität genannt, weil nach dieser ersten Polyelektrolyt-

schicht mehr Ladungen auf der PEMC-Oberfläche lokalisiert sind als vor Aufbringen dieser Schicht. Auf diese Weise ist die Dynamik des Schichtenwachstums initial als exponentiell anzunehmen. Bestätigt wird diese Annahme auch durch Schlenoff und Dubas, die bei Messungen der Dicke von Polyelektrolytmembranen eine geringe Dickenzunahme für die ersten drei bis vier Schichten beobachteten, bis sich bei den folgenden Schichten ein linearer Zuwachs einstellte [72]. Die Überkompensationsmechanismen scheinen im Laufe der weiteren Beschichtungen an Bedeutung zu verlieren, weil sich dann ein lineares Schichtenwachstum einstellt. Einerseits lässt sich dies durch die Zunahme der Ladungsdichte auf der PE-Membran erklären, und andererseits scheinen sich die einzelnen Schichten auch untereinander zu einem Geflecht zu vernetzen, wodurch sich nach einigen Schichten ein Gleichgewicht einstellt, das zu einem linearen Schichtenwachstum führt [47, 48].

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Anzahl aufgebrachter FITC-Trypsin Schichten beantwortet die bei den zellelektrophoretischen Messungen offen gebliebene Frage, ob die Schichten aufeinander aufbauen oder sich lediglich gegenseitig ersetzen. Da sich in den vorliegenden Ergebnissen eine Zunahme der Fluoreszenz von jeder FITC-Trypsin Schicht zur nächsten zeigt, ist davon auszugehen, dass die Schichten aufeinander aufbauen. Caruso und Schüler vermuten bei der Beschichtung von Polystyren-Partikeln mit PSS/PAH und Glucoseoxidase bzw. Meerrettich-Peroxidase eine Desorption des Enzyms durch aufbringen der folgenden Polyelektrolytschicht [75]. Zur Beantwortung der Frage, ob die aufgebrachten Schichten in dem hier vorliegenden Versuchsaufbau durch Weiterbeschichtung die vorhergehenden zumindest zum Teil desorbieren lassen, wurde eine Messreihe durchgeführt, in der nicht nur die PEMC gemessen wurden, die eine weitere FITC-Trypsin Schicht bekommen haben, sondern auch die jeweils darauf folgende Polyelektrolytschicht. Diese Messung zeigt, dass die Fluoreszenzintensität von PEMC mit einer Anzahl von ein bis fünf Schichten FITC-Trypsin nicht abnimmt, wenn auf die jeweilige FITC-Trypsin Schicht eine Schicht Alginate aufgebracht wird. Es ist demnach nicht davon auszugehen, dass die Polyelektrolytschichten die vorher aufgebrachten Trypsin-Schichten desorbieren lassen.

Für die Beschichtung mit FITC-Trypsin und PSS wurde eine Reihe von PEMC

untersucht, die sukzessive mit zehn Polyelektrolytpaaren beschichtet wurden, um den Verlauf des Zuwachses der Fluoreszenzintensität besser interpretieren zu können. Es zeigt sich ein stetiger Zuwachs der Fluoreszenzintensität von Schicht zu Schicht. Dieser Zuwachs lässt sich mit Hilfe einer Trendline als eine lineare Funktion darstellen, deren Bestimmtheitsmaß 0,99 beträgt. Es fällt allerdings auf, dass die gemittelten Messwerte der ersten vier Schichten unterhalb der angepassten Trendlinie liegen. Der Zuwachs der Fluoreszenzintensität ist bei den ersten vier Schichten somit geringer, als bei den folgenden. Erst ab der vierten Schicht zeigt sich ein linearer Zuwachs der Fluoreszenzintensität. Dieser Befund wird durch die Beobachtungen bei den zellelektrophoretischen Messungen aufgewertet, bei denen auffiel, dass die Änderung der Mobilität der PEMC bei den ersten drei Schichten geringer ist als bei den folgenden (s. 4.4). Eine Analoge Beobachtung beschreiben Schlenoff und Dubas [72] bei der Beschichtung von Mikrokapseln PSS/PSASMA. Dort findet sich bei den ersten vier bis fünf Polyelektrolyt-Schichten eine geringere Zunahme der ellipsometrisch bestimmten Schichtendicke als bei den folgenden, bei denen die Schichtendicke linear zunimmt.

## **5.6 Photometrische Messungen**

### **5.6.1 Menge gebundenen Trypsins pro PEMC**

Nachdem die flowzytometrischen Messungen gezeigt haben, dass die aufgetragenen Schichten aufeinander aufbauen und sich nicht gegenseitig ersetzen, wurden die Versuche zur Bestimmung des gebundenen Trypsins pro PEMC aus zwei Gründen durchgeführt. Erstens sollte durch eine zweite, unabhängige Methode nachgewiesen werden, dass die Trypsinmenge mit wachsender Schichtenanzahl zunimmt. Die flowzytometrischen Messungen basieren auf der Beschichtung mit FITC-Trypsin, und es ist vorstellbar, dass sich dieses anders verhält als nicht fluoreszenzmarkiertes Trypsin. Und zweitens sollten diese Messungen die gebundene Trypsinmenge genau quantifizieren, da die flowzytometrischen Messungen lediglich semiquantitative Ergebnisse liefern. Für die folgenden enzymkinetischen Untersuchungen muss die Menge gebundenen

Enzyms bekannt sein, um die Aktivität des gebundenen mit der des freien Trypsins vergleichen zu können.

Die Ergebnisse der Trypsinbestimmungen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Beschichtungsserien Trypsin/PSS und Trypsin/Alginat. Dabei ist der Zuwachs der Trypsinmenge pro PEMC im Falle der Beschichtung mit Trypsin und PSS wesentlich größer als im Falle der Beschichtung mit Trypsin und Alginat. Es ist möglich, dass die Bindung zwischen PSS und Trypsin stärker ist als die zwischen Alginat und Trypsin. Dies kann zunächst dadurch erklärt werden, dass sich die Ladungen von Alginat und PSS bei dem verwendeten pH-Wert unterscheiden, weil PSS stärker anionisch ist als Alginat. Damit sind die elektrostatischen Bindungskräfte zwischen Trypsin und PSS stärker als zwischen Trypsin und Alginat. Weiterhin kann man aus den Ergebnissen der Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Polyelektrolyte auf die Trypsinaktivität (s. 4.2) den Schluss ziehen, dass die Aktivität des Trypsins in Anwesenheit von PSS gemindert wird, weil die Wechselwirkungen zwischen beiden Molekülen stärker ist als die zwischen Trypsin und Alginat. Es ist also anzunehmen, dass im Falle einer Beschichtung mit Trypsin und PSS mehr Trypsin an die PEMC gebunden wird als im Falle einer Beschichtung mit Trypsin und Alginat.

Betrachtet man die Ergebnisse der flowzytometrischen Messungen, so zeigt sich auch hier eine geringere Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Beschichtung mit Trypsin und Alginat im Vergleich zu der Beschichtung mit Trypsin/PSS (s. 4.5). Allerdings ist dieser Unterschied hier nicht so ausgeprägt wie bei den photometrischen Messungen. Während die Steigung der Fluoreszenzintensität pro Schicht für die Beschichtung FITC-Trypsin/PSS mit 80 angegeben wird, ist sie im Falle der Beschichtung mit Trypsin und Alginat 72. Der Unterschied dieser Messverfahren erklärt sich durch die sehr stark streuenden Messwerte der ersten 4 Schichten. Dieses Problem wurde bereits angesprochen (vgl. 4.5). Vergleicht man die Zuwächse zwischen Schichten, bei denen der Zuwachs gebundenen Trypsins linear verläuft, so ähneln sich diese mehr.

Diese Diskussion lässt den Schluss zu, dass bei der Beschichtung von PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS) mit dem PE-Paar Trypsin/Alginat weniger Trypsin an der Kapsel immobilisiert wird, als bei der Beschichtung mit Trypsin und PSS. Die Zunahme der Trypsinmenge pro Kapsel im photometrischen Messverfahren nach Lowry ist



ebenso wie die Zunahme der flowzytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensität im Falle der Beschichtung mit Trypsin und Alginat geringer als bei der Beschichtung mit Trypsin und PSS. Eine eingehende Untersuchung dieses Unterschiedes wird später angestellt (vgl. 5.7).

#### 5.6.2 Aktivität des immobilisierten Trypsins pro einzelner PEMC

Nachdem untersucht wurde, wie viel Trypsin an den PEMC durch die alternierende Beschichtung mit Trypsin und einem Polyelektrolyten immobilisiert wird, sollte weiter bestimmt werden, ob sich die Aktivität des immobilisierten Enzyms im Vergleich zum freien Enzym verändert.

Experimente anderer Arbeitsgruppen haben sich mit der Aktivität von Enzymen (HRP, GOD) beschäftigt, die an PEMC immobilisiert wurden [16, 17]. Dort wurde beobachtet, dass die Aktivität von Glucoseoxidase, die an PEMC immobilisiert wurde, abnimmt, wenn auf diese Enzymschicht weitere Polyelektrolytschichten aufgebracht werden. Nach Aufbringen von fünf PE Schichten sinkt dort die ursprüngliche Aktivität des Enzyms um etwa 50%. Es wird argumentiert, dass die Substratdiffusion zum Enzym und die Produktdiffusion vom Enzym durch das Netzwerk darüber liegender PE-Schichten behindert wird [Onda/Lvov]. Die Enzymaktivität wird einerseits gemindert, weil das Substrat weniger schnell das aktive Zentrum des Enzyms erreicht, andererseits kann der verlangsamte Produktabtransport das Enzym über Mechanismen der Produkthemmung inhibieren oder die Bedingungen in der Umgebung des Enzyms ändern, indem es z.B. zu lokalen Veränderungen des pH-Wertes kommen kann. Eine andere mögliche Erklärung für die Minderung der Aktivität des Enzyms nach Aufbringen weiterer Polyelektrolytschichten wäre eine Blockierung der Enzymbindungsstellen durch die Polyelektrolyte. Die Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Polyelektrolyte auf die Trypsinaktivität (s. 4.2) machen einen derartigen Mechanismus wahrscheinlich, weil die Aktivität des Trypsins dort durch die Anwesenheit von PSS gehemmt wird, obwohl keine organisierten Schichten vorliegen, die eine Substratdiffusion zum Enzym hemmen könnten. Es ist davon auszugehen, dass beide Mechanismen, die schlechteren Diffusionsbedingungen und die direkte Enzyminhibition in den durchgeführten Experimenten einen hem-

menden Einfluss auf die Enzymaktivität haben.

Auch die Ionenstärke der Umgebungslösung kann Einfluss auf die Enzymaktivität haben, da sich die Dichte der Polyelektrolytmembran und die Bindungsstärke zwischen den Polyelektrolyten bei Änderung der Ionenstärke ändert [76].

Im hier durchgeführten Experiment zeigt sich eine Zunahme der Aktivität pro PEMC mit zunehmender Anzahl aufgebrachter Trypsin-Schichten. Diese Zunahme ist für PEMC, die mit Trypsin/PSS beschichtet wurden, größer (Steigung der angepassten Trendlinie 0,74) als für solche, die mit Trypsin/Alginat beschichtet wurden (die Trendlinie dieser Messreihe verläuft mit einer Steigung von 0,51). Dieser Unterschied ist erstaunlich, weil man ausgehend von den eingangs angestellten Überlegungen davon ausgeht, dass die Aktivität pro PEMC im Falle einer Beschichtung mit Trypsin/PSS geringer sein sollte, als im Falle einer Beschichtung mit Trypsin/Alginat, weil das PSS im Unterschied zum Alginat einen hemmenden Einfluss auf die Trypsinaktivität zeigt (s. 4.2.1). Daher würde man für die Beschichtung mit Trypsin/Alginat auch höhere Aktivitätswerte erwarten. Erklärt wird diese Beobachtung durch die Messungen der Trypsinmenge pro PEMC (s. 4.6.1 u. 4.5). Sowohl die photometrischen als auch die flowzytometrischen Messungen zeigen, dass die gebundene Trypsinmenge im Falle der Beschichtung mit Trypsin/Alginat signifikant geringer ist, als im Falle der Beschichtung mit Trypsin/PSS. Ausgehend von der Erkenntnis, dass die PEMC, die mit Trypsin/Alginat beschichtet wurden, weniger Trypsin enthalten, lässt sich die niedrigere Aktivität dieser Kapseln erklären. Die unterschiedliche Trypsinmenge pro PEMC muss normiert werden, um beurteilen zu können, ob die Aktivität der PEMC, die mit Trypsin/PSS beschichtet wurden, tatsächlich eine niedrigere Aktivität haben als diejenigen, die mit Trypsin/Alginat beschichtet wurden. Ein solches Ergebnis würde zeigen, dass neben der diskutierten Hemmung der Enzymaktivität durch erschwerte Substrat- und Produktdiffusion durch die Polyelektrolytmembranen auch die direkte Hemmung des Enzyms durch PSS im verwendeten Versuchsaufbau eine Rolle spielt.

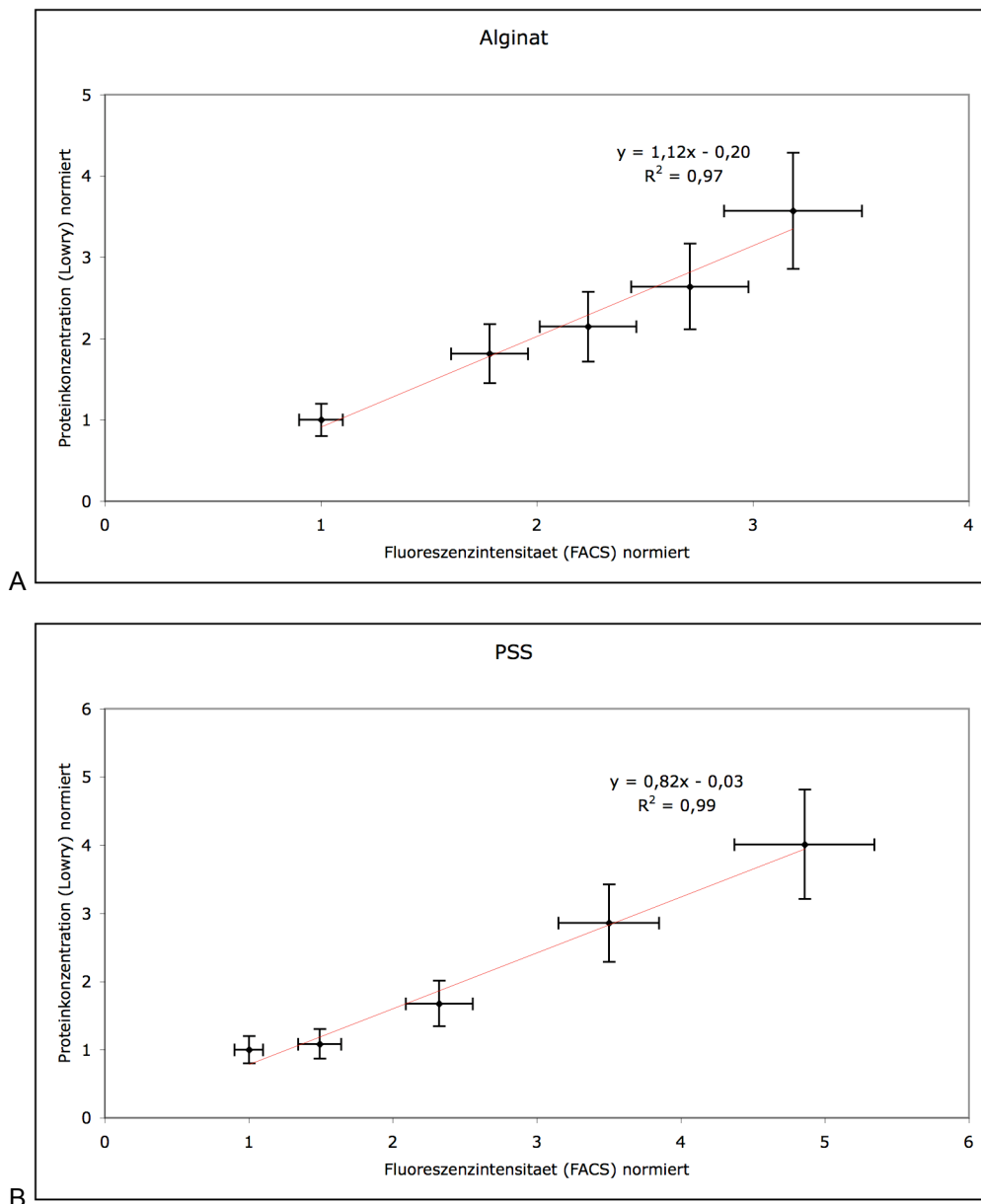
## **5.7 Korrelation zwischen flowzytometrischen und photometrischen Messungen**

Durch Normierung lassen sich unterschiedliche Methoden, deren Messwerte unterschiedliche Dimensionen und Skalierungen besitzen, korrelieren. Dabei werden alle Messwerte einer Reihe jeweils durch den ersten geteilt. So erhält man Faktoren, die das Wachstum innerhalb der Reihe beschreiben. Die Steigungen solcher Reihen unterschiedlicher Methoden lassen sich vergleichen.

Zuerst sollen die photometrischen (Lowry) mit den flowzytometrischen (FACS) Messungen verglichen werden. Beide Methoden messen indirekt die Menge gebundenen Trypsins pro PEMC. Ziel dieser Auswertung ist es, die Korrelation der Messungen für fünf aufeinander folgende Trypsin-Schichten zu überprüfen. Dafür wurden fünf aufeinander folgende Trypsinschichten beider Beschichtungsserien gewählt, bei denen die Messwerte annähernd linear verliefen.

Die normierten Werte beider Methoden wurden berechnet und in einem Punktdiagramm dargestellt. In diesem Diagramm sind auf der Abszisse die normierten Werte der flowzytometrischen Intensität und auf der Ordinate die entsprechenden Werte der photometrisch bestimmten Proteinmenge aufgetragen. Die einzelnen Punkte entsprechen fünf jeweils aufeinander folgenden Trypsin-Schichten. Würden die beiden Methoden exakt korrelieren, würde die Steigung einer Ausgleichsgeraden durch die fünf Punkte mit eins angegeben. Das würde bedeuten, dass z.B. die Verdoppelung der bestimmten Fluoreszenzintensität (FACS) ebenfalls eine Verdoppelung der photometrisch bestimmten Proteinmenge pro PEMC entspräche.

Es wurden fünf Beschichtungen mit einer Anzahl von eins bis fünf Schichten Trypsin bzw. FITC-Trypsin ausgewertet. Im Falle der Beschichtung mit Alginat und Trypsin (Lowry) bzw. FITC-Trypsin (FACS) lässt sich diesen fünf Punkten eine Trendlinie anpassen, deren Bestimmtheitsmaß 0,97 beträgt. Die Steigung dieser Trendlinie beträgt 1,1. Im Falle der Beschichtung mit PSS und Trypsin bzw. FITC-Trypsin lässt sich eine Trendlinie anpassen, deren Steigung 0,8 beträgt. Das entsprechende Bestimmtheitsmaß ist mit 0,99 angegeben.



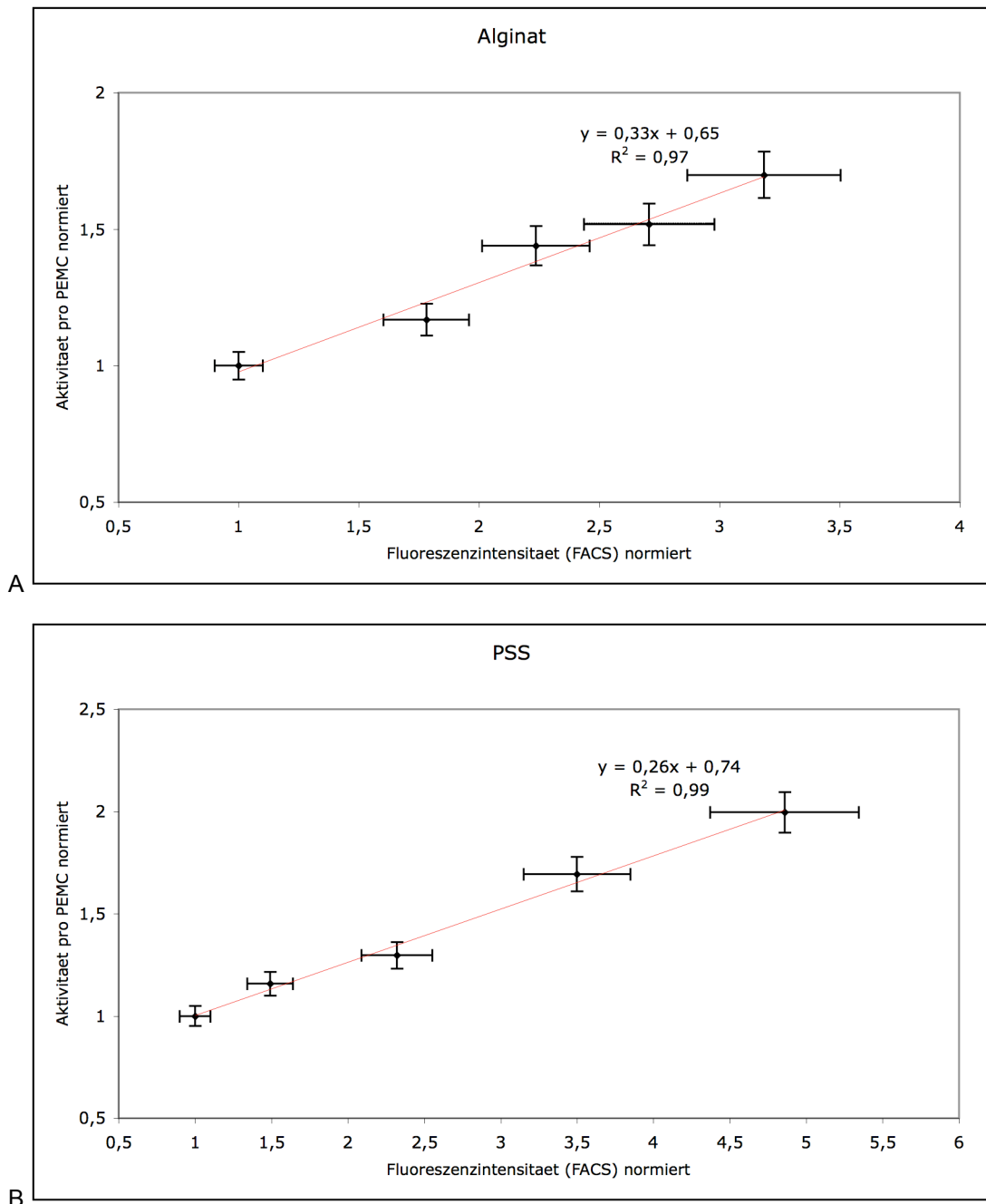
**Abb. 34: Korrelation der normierten Messwerte** der photometrisch bestimmten Proteinkonzentration pro PEMC (Lowry) und der flowzytometrisch bestimmten, normierten mittleren Fluoreszenzintensität. Rot ist eine angepasste Trendlinie abgebildet, deren Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß in der Abbildung angegeben sind. Dargestellt sind Mittelwerte (dimensionslos) und eine Standardabweichung.  $n=3$ . A = Beschichtungsserie mit Alginate und Trypsin bzw. FITC-Trypsin, B = Beschichtungsserie mit PSS und Trypsin bzw. FITC-Trypsin.

Die dargestellten Diagramme zeigen eine Korrelation zwischen den flowzytometrischen und den photometrischen Messungen. Die Steigung im Falle der Beschichtung mit Trypsin/PSS ist mit  $1,1 > 1$  und im Falle der Beschichtung mit Trypsin/Alginate mit  $0,8 < 1$ . Dieser Unterschied lässt allerdings im dargestellten Fehlerbereich keine signifikante Trennung der Werte zu. Es kann angenommen werden, dass beide Messungen korrelieren, wobei der summierte Fehler (Messfehler und Präparationsvariationen) etwa 20% beträgt.

Um der Lösung des im vorigen Kapitel offen gebliebenen Problems näher zu kommen, wurden in einem zweiten Schritt die normierten Werte der flowzytometrisch bestimmten mittleren Fluoreszenzintensität (FACS) mit den normierten Messwerten der enzymkinetisch bestimmten Aktivität pro PEMC (s. 4.6.2) verglichen. In diesem Aufbau ist die gebundene Enzymmenge pro PEMC normiert, da sie sich in den flowzytometrisch bestimmten und normierten Werten verbirgt. Das dargestellte Diagramm (s. Abb. 35) ist analog zu dem vorhergehenden aufgebaut. Hier zeigt die Ordinate die normierten Fluoreszenzintensitäten (FACS) und die Abszisse die ebenfalls normierten Werte der photokinetisch bestimmten Enzymaktivität pro PEMC. Die fünf dargestellten Punkte entsprechen fünf aufeinander folgenden Trypsin-Schichten. Auch hier wurden die zwischen den Trypsin-Schichten liegenden Polyelektrolytschichten nicht dargestellt. Ebenfalls gilt in diesem Diagramm, dass eine Steigung der Ausgleichsgeraden durch die fünf Punkte das Ausmaß der Korrelation bestimmt, da die Werte normiert sind. Würde die Steigung 1 betragen, müsste eine 1:1-Korrelation vorliegen. Das würde bedeuten, dass z.B. eine Verdopplung der gemessenen Fluoreszenzintensität – respektive der gebundenen Trypsinmenge – ebenfalls zu einer Verdopplung der Enzymaktivität führt.

Für die Werte der Beschichtungsserie Alginat/Trypsin bzw. FITC-Trypsin ließ sich eine Trendlinie mit einer Steigung von 0,33 anpassen, deren Korrelationskoeffizient 0,97 beträgt.

Auch für die Beschichtungsserie PSS/ Trypsin bzw. FITC-Trypsin ließ sich eine Trendlinie anpassen, deren Steigung allerdings mit 0,26 kleiner ist. Ihr Bestimmtheitsmaß beträgt 0,99.



**Abb. 35: Korrelation der normierten Messwerte** der flowzytometrisch bestimmten, normierten mittleren Fluoreszenzintensität und den enzymkinetisch bestimmten (normierten) Aktivitätswerten pro PEMC. Rot ist eine angepasste Trendlinie abgebildet, deren Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß in der Abbildung angegeben sind. Dargestellt sind Mittelwerte (dimensionslos) und eine Standardabweichung.  $n=3$ . A = Beschichtungsserie mit Alginate und Trypsin bzw. FITC-Trypsin, B = Beschichtungsserie mit PSS und Trypsin bzw. FITC-Trypsin.

Augenfällig ist die Beobachtung, dass beide Steigungen deutlich kleiner als eins sind. Diese Beobachtung bedeutet, dass die gemessene Fluoreszenzintensität als indirektes Maß der Proteinmenge pro PEMC deutlich höher ist als die Aktivität der entsprechenden Beschichtungen. Praktisch bedeutet das, dass die jeweiligen Beschichtungen mehr Trypsin enthalten als an Aktivität gemessen wurde. Im

Umkehrschluss muss man annehmen, dass ein gewisser Anteil des adsorbierten Trypsins inaktiv ist. Die Enzymaktivität muss demnach durch die Beschichtung gehemmt worden sein. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Arbeiten gemacht und bereits im vorigen Kapitel angesprochen.

Zwei Mechanismen der Hemmung scheinen eine Rolle zu spielen. Der eine besteht in einer Hemmung der Diffusion des Substrates zum Enzym und des Produktes vom Enzym sowie lokale Veränderungen des pH-Wertes oder der Ionenkonzentration im direkten Umfeld des Enzyms. Dieser Hemmmechanismus beruht auf einer erschwerten Diffusion der beteiligten Substanzen durch die netzartige Struktur der von Schicht zu Schicht dicker werdenden Polyelektrolytschicht. Tief liegende Enzymschichten, die von mehreren Polyelektrolyt/Enzym-Schichten überdeckt werden, sind offenbar nicht mehr voll aktiv. Dieser Mechanismus wurde im vorigen Kapitel (4.6.2) bereits diskutiert.

Der zweite Mechanismus, der zu einer Hemmung der Enzymaktivität beitragen könnte, ist die direkte Hemmung des Trypsins durch PSS. Die Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Polyelektrolyte auf die Aktivität des Trypsins (s. 4.2) haben gezeigt, dass PSS im Gegensatz zu Alginat eine Hemmung der Aktivität verdünnter Trypsinlösungen verursacht. In der Literatur finden sich leider keine Untersuchungen über die Wechselwirkung von PSS und Trypsin zum Vergleich. Da es mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht gelingt, die Menge des PSS zu quantifizieren, die bei der verwendeten Methode an den PEMC adsorbiert, muss diese geschätzt werden. Dennoch kann man die Ergebnisse aus den Vorexperimenten (s. 4.2) nicht einfach auf den verwendeten Versuchsaufbau zur Beschichtung übertragen, weil keine organisierten Schichten vorlagen. Dennoch ist davon auszugehen, dass eine Hemmung des Trypsins in den Schichten der PEMC durch ebenfalls in den Schichten vorhandenes PSS eine Rolle spielt. Zur Verifizierung dieser Annahme können die dargestellten Korrelationsdiagramme (s. Abb. 34 u. 35) herangezogen werden. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden unterscheiden sich nicht nur, wie vorher diskutiert, signifikant von der 1, sondern lassen sich ebenfalls signifikant voneinander unterscheiden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden für die Beschichtungen mit Trypsin/PSS ist mit 0,26 deutlich kleiner als die der Beschichtungen mit Trypsin/Alginat (0,33). Dieser Steigungsunterschied bedeutet, dass mit steigender

Menge gebundenen Enzyms pro PEMC die Aktivität im Falle der Beschichtung mit Trypsin/PSS langsamer ansteigt, als bei der Beschichtung mit Trypsin/Alginat. Dieser Unterschied lässt sich nicht wie im vorigen Kapitel (vgl. 4.6.2) mit einer unterschiedlichen Menge gebundenen Trypsins begründen, weil die Menge gebundenen Trypsins in die Normierung mit eingegangen ist. Bei den PEMC, die mit Trypsin/PSS beschichtet wurden, ist der Anteil des aufgetragenen Trypsins, der inaktiv, also gehemmt ist, größer, als bei den PEMC, die mit Trypsin/Alginat beschichtet wurden. Daraus lässt sich folgern, dass der beobachtete hemmende Effekt des PSS auf die Aktivität des Trypsins im verwendeten Versuchsaufbau zur Beschichtung von PEMC eine Rolle spielt.

Um beide diskutierten Hemmungsmechanismen hinsichtlich ihrer Bedeutung im verwendeten Versuchsaufbau zu bewerten, kann ebenfalls die dargestellte Korrelationsgrafik herangezogen werden. Wie oben erläutert, würde eine Steigung der Ausgleichsgeraden für die fünf dargestellten Punkte von 1 eine 1:1-Korrelation implizieren. Es zeigen sich jedoch Steigungen von 0,33 und 0,26. Die Unterscheidung der beiden Steigungswerte von der 1 gibt das Ausmaß der Summe beider Hemmungsmechanismen an. Da in dem Vorversuch zum Einfluss unterschiedlicher Polyelektrolyte (vgl. 4.2) keine Hemmung der Enzymaktivität durch Alginat im verwendeten Konzentrationsbereich gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass im Falle der Beschichtung von PEMC mit Trypsin/Alginat die Hemmung der Enzymaktivität durch andere Mechanismen verursacht wird; in diesem Falle eine Hemmung durch erschwerte Diffusion (vgl. 4.6.2), und nicht durch eine direkte Hemmung des Enzyms durch das Alginat. Dieser Mechanismus müsste in gleichem Maße auf die PEMC wirken, die mit Trypsin/PSS beschichtet wurden. Daraus lässt sich folgern, dass der Steigungsunterschied von einer hypothetischen ungehemmten Korrelation der Steigung 1 zu der Korrelation der Beschichtung Trypsin/Alginat mit 0,33 durch erschwerte Diffusion erklärt werden kann. Der zusätzliche Unterschied zwischen den Werten für die Beschichtung Trypsin/Alginat (0,33) zu den Werten für die Beschichtung mit Trypsin/PSS (0,26) ist dann durch die direkte Hemmung des Trypsins durch PSS zu erklären. Damit ist das Ausmaß der Hemmung der Enzymaktivität durch erschwerte Diffusion deutlich größer als die durch PSS vermittelte direkte Enzymhemmung. Diese zusätzliche Hemmung beträgt nur knapp 30% der bereits durch andere Mechanismen vermittelten Hemmung.



Die Gesamthemmung, also der Unterschied zwischen einer 1:1-Korrelation in Abb. 34 und 35 (Steigung von 1 und der gemessenen Steigung von 0,33 bzw. 0,26), lässt darauf schließen, dass die Gesamthemmung etwa 60-70% beträgt. Das entspräche einer verbleibenden Aktivität des immobilisierten Enzyms von etwa 30%. Dieses Ergebnis deckt sich in etwa mit den Versuchen zum Vergleich der Aktivität des freien im Vergleich zum immobilisierten Enzym (vgl. 4.6.4).

Der beschriebene Mechanismus der Aktivitätsminderung des Enzyms durch erschwerte Diffusion soll hier näher untersucht werden. Betrachtet man die Korrelationsgrafik, so sieht man, dass die Messwerte sich gleichmäßig um die Ausgleichsgerade verteilen. Auch in den Ergebnissen der Versuche, in denen die Aktivität in Abhängigkeit von der aufgetragenen Trypsinmenge oder der Kapsel- und Schichtenanzahl dargestellt werden (vgl. 4.6.2 u. 4.6.3), sind lineare Beziehungen zu sehen. Unter der Annahme, dass die Einschränkung der Diffusion des Substrates die Hemmung des Enzyms dominiert, würde man jedoch theoretisch Sättigungskurven erwarten. Stellt man sich ein Modell einer PEMC vor, die mit einer großen Anzahl Schichten versehen wird, wobei nur die Substratdiffusion die Enzymaktivität hemmt, würde man annehmen, dass sehr tief liegende Schichten irgendwann keine messbare Aktivität mehr zeigen. In diesem Modell würde demnach eine unendliche Weiterbeschichtung dazu führen, dass nach aufbringen einer großen Anzahl von Schichten immer nur eine begrenzte Anzahl außen liegender Enzym-Schichten aktiv wäre. Mit jeder weiteren Beschichtung würde dabei eine neue aktive Schicht hinzugefügt und im Austausch eine tiefere Schicht wieder inaktiv, weil diese nun zu tief liegt, um messbare Aktivität zu zeigen. Es würde sich also die gemessene Aktivität der PEMC im Bereich dieses steady-states nicht mehr erhöhen, trotz einer höheren Anzahl von aufgetragenen Schichten. Gleichzeitig wird jedoch stets das gesamte aufgetragene Trypsin durch die Proteinbestimmung quantitativ erfasst. Damit würde der experimentell ermittelte Anteil des inaktiven Trypsins zunehmen. In diesem Modell müsste demnach eine Messung, die die Aktivität pro PEMC bestimmt, irgendwann ein Maximum im Sinne einer Sättigungsfunktion erreichen. Eine Messung, die die Aktivität bezogen auf die gemessene Trypsinkonzentration einer PEMC bestimmt, würde irgendwann eine negative Steigung zeigen, weil der Anteil des inaktiven Trypsins den des Aktiven übersteigt. Im beobachteten Bereich weniger Schichten scheinen diese Mechanismen allerdings noch keine große Rolle zu spielen, da sich hier noch

lineare Beziehungen zeigen. Es lässt sich jedoch feststellen, dass im Bereich von fünf Schichten offenbar alle Schichten aktiv an der enzymatischen Umsetzung teilnehmen. Anderenfalls würden sich keine linearen Beziehungen zeigen. Diese linearen Beziehungen sagen schließlich aus, dass stets ein fester Anteil des aufgebrauchten Enzyms aktiv ist, und nicht nur z.B. die äußeren drei Schichten.

#### **5.8 Diskussion der vergleichenden Versuche zum Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität von freiem und immobilisiertem Trypsin**

Die Versuche zum Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität für freies und für –auf unterschiedliche Weise- immobilisiertes Enzym verfolgten einerseits das Ziel, die pH-Profile der Enzymaktivität, die im Rahmen der hier angewendeten Methode erzielt wurden, mit denen der Literatur zu vergleichen. Andererseits sollte untersucht werden, ob die Immobilisation an der Polyelektrolytmembran zu einer Änderung des pH-Optimums des Trypsins führt, wie es für Glucoseoxidase (GOD) beschrieben ist. Dort führte eine Immobilisation des Enzyms in PE Layern mit PSS an PS-Partikeln zu einer Abflachung des pH-Profiles, was bedeutet, dass das Enzym nach immobilisation bei suboptimalen pH-Bedingungen eine höhere Aktivität aufweist als nicht immobilisiertes Enzym [17]. Glucose Oxidase zeigte überdies nach Immobilisation an einer Polyelektrolytmembran ein flacheres pH-Profil. Das bedeutet, dass der pH-Wert-Bereich, in dem das Enzym effektiv arbeitet, vergrößert wurde [75].

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der im Rahmen der Beschichtung verwendete Polyelektrolyt ebenfalls einen Einfluss auf das pH-Optimum zeigt und sich Unterschiede zwischen den einzelnen Polyelektrolyten ausmachen lassen.

Es zeigt sich, dass das pH-Optimum des freien Trypsins in wässriger Lösung im verwendeten Versuchsaufbau bei pH 9 liegt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Angaben der Literatur, wo das pH-Optimum in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau zwischen 7,5 und 9,5 beschrieben wird [1, 10, 55, 80]. Auch der glockenförmige, symmetrische Kurvenverlauf wurde sehr ähnlich beobachtet [1, 4, 65]. Die Untersuchung von PEMC ((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS), die ausschließlich mit einer Schicht Trypsin beschichtet wurden, also keine Polyelektrolytschicht erhielten, ergab ein um 0,5 Einheiten höher liegendes pH-Optimum. Bei der Untersuchung von PEMC

((PSS/PAH)<sub>2</sub>PSS), die mit Trypsin und einem Polyelektrolyt beschichtet wurden (Trypsin-PE-Trypsin), zeigte sich ein ähnliches pH-Profil. Unabhängig von der Wahl des Polyelektrolyten, PSS oder Alginat, wurde auch hier ein um 0,5 Einheiten höheres pH-Optimum gefunden als für das freie Enzym.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Enzym durch die Immobilisation in der PEMC-Membran Veränderungen erfährt, die das aktive Zentrum betreffen. So kann es zu einer Verschiebung des pH-Optimums kommen. Die Art dieser Interaktion zu untersuchen war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Diese Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass die Interaktionen von Enzymen und Polyelektrolytmembranen noch nicht vollständig verstanden wurden. Im vorigen Abschnitt wurden zwei Mechanismen diskutiert, die die Enzymaktivität im Rahmen der Immobilisation hemmen. Die erschwerte Substratdiffusion durch die netzartige Polyelektrolytmembran zum einen und die direkte Inhibition des Enzyms durch PSS (vgl. 4.2.1) zum anderen. Da in dem hier besprochenen Versuch eine Verschiebung des pH-Optimums für immobilisiertes Trypsin unabhängig von der Wahl des Polyelektrolyten beobachtet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass es noch weitere Interaktionen zwischen Polyelektrolyt und Enzym gibt, die bislang nicht untersucht wurden. Offenbar kommt es durch die Immobilisation zu Änderungen der Enzymstruktur, die eine Verschiebung des pH-Optimums verursachen und möglicherweise ebenfalls die Enzymaktivität hemmen.

## 6 Verzeichnis der Abkürzungen und Formelzeichen

CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie ( <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
$(\text{DxSO}_4/\text{PAH})_n\text{DxSO}_4$	gibt die Anzahl der alternierend aufgetragenen $\text{DxSO}_4$ und PAH Schichten wieder
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EPM	elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glutaraldehyd
HSA	Humanes Serumalbumin
LSM	Laser Scanning Mikroskopie ( <i>laser scanning microscopy</i> )
PAH	Poly(allylaminhydrochlorid)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyelektrolyt
PEMC	Polyelektrolytmikrokapsel ( <i>polyelectrolyte microcapsule</i> )
PSASMA	
PSS	Poly(natriumstyrenesulfonat) ( <i>sodium poly(styrene sulfonate)</i> )
$(\text{PSS}/\text{PAH})_n\text{PSS}$	gibt die Anzahl der alternierend aufgetragenen PSS und PAH Schichten wieder
RBC	Rote Blutzellen ( <i>red blood cells</i> )
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## Formelzeichen

$b$	$[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$	elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität)
$d$	$[\text{m}]$	(Außen-)durchmesser
$\vec{E}$	$[\text{V m}^{-1}]$	elektrische Feldstärke
$M_W$	$[\text{Da}]$	Molekulargewicht
$s$	$[\text{m}]$	Wandstärke
$T$	$[\text{°C}]$	Temperatur
$\varepsilon_r$	$[-]$	Dielektrizitätszahl
$\varepsilon_o$	$[\text{C V}^{-1} \text{m}^{-1}]$	elektrische Feldkonstante
$\zeta$	$[\text{V}]$	$\zeta$ -Potential, elektrokinetisches Potential
$\eta$	$[\text{Pa s}]$	Viskosität
$\rho$	$[\text{kg/m}^3]$	Dichte
$\pi$	$[\text{osm}]$	osmotischer Druck
$\vec{v}$	$[\text{m s}^{-1}]$	Geschwindigkeit

## 7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	SFM-Aufnahme von Luftgetrockneten Polyelektrolytmikrokapseln [30]	5
Abb. 2:	Schema des Vorgehens zur Layer-by-Layer-Technologie [22]	6
Abb. 3:	Strukturformeln von Poly(natriumstyrenesulfonat) (PSS), Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH) und Alginat	9
Abb. 4:	Transmissionselektronenmikroskopische fixierter Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten [59].	10
Abb. 5:	photometrisch aufgezeichnete Wellenlängenspektren von	

	Trypsin und FITC-Trypsin.	18
Abb. 6:	Schematische Darstellung der konsekutiven Polyelektrolytanlagerung an die Erythrozytenmembran. [Bäumler 2003]	19
Abb. 7:	Strahlengang in einem CLSM. [89]	22
Abb. 8:	Darstellungsoptionen der Software FACS-Diva.	26
Abb. 9:	Schematische Darstellung des blauviolettfarbenen Komplexes, auf dessen Entstehen die Proteinbestimmung nach Lowry beruht.	28
Abb. 10:	photometrisch gemessene Trypsinkonzentration in den Überständen	31
Abb. 11:	Einfluss der PSS-Konzentration auf die Trypsinaktivität.	32
Abb. 12:	Einfluss der Alginat-Konzentration auf die Trypsinaktivität.	33
Abb. 13:	Einfluss der Dextransulphat-Konzentration auf die Trypsinaktivität	34
Abb. 14:	Lokalisation des Fluoreszenzsignals (CLSM).	35
Abb. 15:	Intensität des Fluoreszenzsignals	35
Abb. 16:	Darstellung der Fluoreszenzintensität entlang einer Messlinie in CLSM-Aufnahmen	36
Abb. 17:	Darstellung der häufigsten Fluoreszenzintensitäten aus CLSM-Aufnahmen von PEMC	37
Abb. 18:	Zellelektrophoretische Mobilität von PEMC, die alternierend mit PSS und Trypsin beschichtet wurden.	39
Abb. 19:	Zellelektrophoretische Mobilität von PEMC, die alternierend mit Alginat und Trypsin beschichtet wurden.	40
Abb. 20:	Histogramm von PEMC, die alternierend mit FITC-Trypsin und Alginat beschichtet wurden.	41
Abb. 21:	relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl	42
Abb. 22:	relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl	43
Abb. 23:	Relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Schichtenanzahl	44
Abb. 24:	Trypsin-Standardkurve zur Errechnung von Trypsinkonzentrationen	45

Abb. 25:	Trypsinmenge in pg pro PEMC bei Beschichtung mit Trypsin und PSS.	46
Abb. 26:	Trypsinmenge in pg pro PEMC bei Beschichtung mit Trypsin und Alginat.	47
Abb. 27:	Aktivität bezogen auf einzelne PEMC.	48
Abb. 28:	Aktivität von mit Trypsin beschichteten PEMC bezogen auf die photometrisch bestimmte Trypsinkonzentration (Lowry).	49
Abb. 29:	Aktivität von Trypsinlösungen in Tris-Puffer (pH 7,4) bei unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen.	50
Abb. 30:	Darstellung der verbleibenden Aktivität des an PEMC immobilisierten Trypsins	51
Abb. 31:	Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes.	52
Abb. 32:	Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes. Beschichtung mit Trypsin/Alginat	53
Abb. 33:	Untersuchung der Enzymaktivität bei Änderung des pH-Wertes. Beschichtung mit Trypsin/PSS	53
Abb. 34:	Korrelation der normierten Messwerte der photometrisch bestimmten Proteinkonzentration pro PEMC (Lowry) und der flowzytometrisch bestimmten, normierten mittleren Fluoreszenzintensität.	66
Abb. 35:	Korrelation der normierten Messwerte der flowzytometrischen mittleren Fluoreszenzintensität und den enzymkinetisch bestimmten Aktivitätswerten pro PEMC.	68
Tab. 1:	Verwendete Chemikalien	16
Tab. 2:	Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses des Polyanions auf die Enzymaktivität.	3

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ahsan, M. N. and S. Watabe (2001). "Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*." *J Protein Chem* 20(1): 49-58.
2. Alexiou, C., W. Arnold, et al. (2000). "Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting." *Cancer Res* 60(23): 6641-8.
3. Antipov, A. A. and G. B. Sukhorukov (2004). "Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability." *Adv Colloid Interface Sci* 111(1-2): 49-61.
4. Asgeirsson, B., J. W. Fox, et al. (1989). "Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*." *Eur J Biochem* 180(1): 85-94.
5. Balabushevich, N. G., O. P. Tiourina, et al. (2003). "Loading the multilayer dextran sulfate/protamine micro-sized capsules with peroxidase." *Biomacromolecules* 4(5): 1191-7.
6. Balabushevich, N. G., G. B. Sukhorukov, et al. (2001). "Encapsulation of proteins by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes onto protein aggregates: factors regulating the protein release." *Biotechnol Bioeng* 76(3): 207-13.
7. Bäuml, H., G. Artmann, et al. (2000). "Plastic behaviour of polyelectrolyte microcapsules derived from colloid templates." *J Microencapsul* 17(5): 651-5.
8. Bäuml, H., B. Neu, et al. (2001). "Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions." *Biorheology* 38(1): 39-51.
9. BD Biosciences FACSCanto Users Guide
10. Bergmeyer, U. (1984). "Methods of Enzymatic Analysis." V(3): 119-129.
11. Bernkop-Schnurch, A. (1998). "The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins." *J Control Release*(52): 1-16.
12. Bossi, A., L. Guizzardi, et al. (2004). "Controlled enzyme-immobilisation on capillaries for microreactors for peptide mapping." *Anal Bioanal Chem* 378(7): 1722-8.
13. Cao, G., Hong, H.-G., Mallouk, T. E. (1992) *Acc. Chem. Res.* 25, 420
14. Caruso, F. (2000). "Hollow capsule processing through colloidal templating and self-assembly." *Chem* 6(3): 413-9.
15. Caruso, F. D., E; Mohnwald, H; Georgieva, R (1998). "Fluorescence Studies of the Binding of Anionic Derivatives of Pyrene and Fluorescein to Cationic Polyelectrolytes in Aqueous Solution." *Macromolecules*(31): 7365-7377.
16. Caruso, F. M., H; Trau, D; Renneberg, R. (2000). "Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules." *Langmuir*(16): 1458-1488.



17. Caruso, F. S., C. (2000). "Enzyme Multilayers on Colloid Particles Assembly, Stability, and Enzymatic Activity." *Langmuir*(16): 9595-9603.
18. Caruso, F. S., M et al (2000). "Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach." *Chem. Mater.* 13: 109-116.
19. Chu, L. Y., Y. J. Liang, et al. (2004). "Preparation of glucose-sensitive microcapsules with a porous membrane and functional gates." *Colloids Surf B Biointerfaces* 37(1-2): 9-14.
20. Chui, W. K. and L. S. Wan (1997). "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres." *J Microencapsul* 14(1): 51-61.
21. Dai, Z., A. Heilig, et al. (2004). "Novel formulations of vitamins and insulin by nanoengineering of polyelectrolyte multilayers around microcrystals." *Chemistry* 10(24): 6369-74.
22. Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *Science* 277: 1232-1237.
23. Dejugnat, C. and G. B. Sukhorukov (2004). "pH-responsive properties of hollow polyelectrolyte microcapsules templated on various cores." *Langmuir* 20(17): 7265-9.
24. Donath, E., S. Moya, et al. (2002). "Hollow polymer shells from biological templates: fabrication and potential applications." *Chemistry* 8(23): 5481-5.
25. Donath, E. S., GB; Caruso, F; Davis, SA; Mohnwald, H (1998). "Neuartige Polymerhohlkoerper durch Selbstorganisation von Polyelektrolyten auf kolloidalen Tmplaten." *Angew. Chem.* 110(16): 2323-2327.
26. Donath, E. W., D.; Shilov, VN; Knippel, E; Budde, A; Lowack, K; Helm, CA; Mohnwald, H (1997). "Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer-by-Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Caharged Polystyrene Latex Particles." *Langmuir*(13): 5294-5305.
27. Dubas, S. S., JB (2001). "Swelling and Smoothing of Polyelectrolyte Multilayers by Salt." *Langmuir*(17): 7725-7727.
28. Erlanger, B. F., N. Kokowsky, et al. (1961). "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin." *Arch Biochem Biophys* 95: 271-8.
29. Estrela-Lopez, I. L., S; Moya, S; Brandt, A; Donath, E; Mohnwald, H (2002). "SANS Studies of Polyelectrolyte Multilayers on Colloidal Templates." *Langmuir*(18): 7861-7866.
30. Fuentes, M., B. C. Pessela, et al. (2004). "Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran." *Biotechnol Prog* 20(4): 1134-9.
31. Gao, C., S. Leporatti, et al. (2003). "Swelling and shrinking of polyelectrolyte microcapsules in response to changes in temperature and ionic strength." *Chemistry* 9(4): 915-20.
32. Gao, C.Y., Leporatti, S., Donath, E., Möhwald, H. (2000): "Surface texture of poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl-ammonium

- chloride) micron-sized multilayer capsules: A scanning force and confocal microscopy study." *J. Phys. Chem.*, **B104**, 7144-7149
33. Ge, L., H. Mohwald, et al. (2003). "Phospholipase A2 hydrolysis of mixed phospholipid vesicles formed on polyelectrolyte hollow capsules." *Chemistry* 9(11): 2589-94.
  34. Ge, L., H. Mohwald, et al. (2003). "Polymer-stabilized phospholipid vesicles formed on polyelectrolyte multilayer capsules." *Biochem Biophys Res Commun* 303(2): 653-9.
  35. Georgieva, R., S. Moya, et al. (2002). "Permeation of macromolecules into polyelectrolyte microcapsules." *Biomacromolecules* 3(3): 517-24.
  36. Georgieva, R., S. Moya, et al. (2004). "Permeability and conductivity of red blood cell templated polyelectrolyte capsules coated with supplementary layers." *Langmuir* 20(5): 1895-900.
  37. Gordon, V. D., X. Chen, et al. (2004). "Self-assembled polymer membrane capsules inflated by osmotic pressure." *J Am Chem Soc* 126(43): 14117-22.
  38. Gruemmer, G. K., E et al. (1995). "An Electrophoretic Instrumentation for the Multi-Parameter Analysis of Cells and particles." *Instr. Sci. Techn* 23: 265-276.
  39. Haisch, A., A. Groger, et al. (2000). "Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation." *Biomaterials* 21(15): 1561-6.
  40. HITACHI Spektrophotometer K2800 Users Guide
  41. Ito, N., Y. Iwamori, et al. (1998). "Inhibition of pancreatic elastase by sulfated lipids in the intestinal mucosa." *J Biochem (Tokyo)* 123(1): 107-14.
  42. Jain, S., I. Roy, et al. (2004). "A smart bioconjugate of trypsin with alginate." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 32(2): 325-37.
  43. Jaturanpinyo, M., A. Harada, et al. (2004). "Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde." *Bioconjug Chem* 15(2): 344-8.
  44. Khopade, A (2004)
  45. Khopade, A. J., N. Arulsudar, et al. (2005). "Ultrathin antibiotic walled microcapsules." *Biomacromolecules* 6(1): 229-34.
  46. Khopade, A. J. and F. Caruso (2002). "Stepwise self-assembled poly(amidoamine) dendrimer and poly(styrenesulfonate) microcapsules as sustained delivery vehicles." *Biomacromolecules* 3(6): 1154-62.
  47. Ladam, G., C. Gergely, et al. (2000). "Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers." *Biomacromolecules* 1(4): 674-87.
  48. Ladam, G., P. Schaaf, et al. (2002). "Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films." *Biomol Eng* 19(2-6): 273-80.
  49. Larionova, N. V., G. Ponchel, et al. (1999). "Biodegradable cross-linked starch/protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein

- administration." *Int J Pharm* 189(2): 171-8.
50. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.
  51. Lubbe, A. S., C. Alexiou, et al. (2001). "Clinical applications of magnetic drug targeting." *J Surg Res* 95(2): 200-6.
  52. Lvov Yu, M. and G. B. Sukhorukov (1997). "Protein architecture: assembly of ordered films by means of alternated adsorption of oppositely charged macromolecules." *Membr Cell Biol* 11(3): 277-303.
  53. Lvov Yu, M. A., A.; Mohnwald, H; Sukhorukov, G.B. (2001). "Urease Encapsulation in Nanoorganized Microshells." *Nano Letters* 1(3): 125-128.
  54. Mai, G., N. T. Huy, et al. (2005). "Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes." *Transplant Proc* 37(1): 527-9.
  55. Markvicheva, E. A., N. E. Tkachuk, et al. (1996). "Stabilization of proteases by entrapment in a new composite hydrogel." *Appl Biochem Biotechnol* 61(1-2): 75-84.
  56. Mittlochner, R (2003): „Design und Charakterisierung von Polyelektrolytmikrokapseln“
  57. Moya, S., Dähne, L., Voigt, A., Leporatti, S., Donath, E., Möhwald, H. (2001): „Polyelectrolyte Multilayer Capsules Templated on Biological Cells: Core Oxidation Influences Layer Chemistry“ *Colloids Surf., A* 2001, 183-185, 27-40
  58. Moya, S., G. B. Sukhorukov, et al. (1999). "Microencapsulation of Organic Solvents in Polyelectrolyte Multilayer Micrometer-Sized Shells." *J Colloid Interface Sci* 216(2): 297-302.
  59. Muthukumar, M. O., CK; Thomas, EL (1997). "Competing Interactions and Levels of Ordering in Self-Organizing Polymeric Materials." *Science* 277: 1225-1231.
  60. Netzer, L., Sagiv, J. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105, 674.
  61. Neu, B., H. J. Meiselman, et al. (2002). "Electrophoretic mobility of human erythrocytes in the presence of poly(styrene sulfonate)." *Electrophoresis* 23(15): 2363-8.
  62. Neu, B. V., A; Mitloehner, R; Leopratti, S; Gao, CY; Donath, E; Kiesewetter, H; Mohnwald, H; Meislemann, HJ; Bäuml, H (2000). "Biological cells as templates for hollow microcapsules." *J. Microencapsulation*: 1-11.
  63. Ohnishi, S. T. and J. K. Barr (1978). "A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents." *Anal Biochem* 86(1): 193-200.
  64. Orive, G., A. M. Carcaboso, et al. (2005). "Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules." *Biomacromolecules* 6(2): 927-31.
  65. Pavlisko, A. R., A.; Coppes Z. (1999). "Purification and Characterization of a Protease from the Pyloric Caeca of Menhaden and Mullet from the southwest atlantic region." *J. Food Biochem.* 23: 225-241.

66. Peyratout, C. S. and L. Dahne (2004). "Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers." *Angew Chem Int Ed Engl* 43(29): 3762-83.
67. Proteomic Tools, Onlineserver [www. ExPASy.org](http://www.ExPASy.org)
68. Qio, X. L., S; Donath, E; Mohnwald, H (2001). "Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles." *Langmuir*(17): 5375-5380.
69. Radtchenko, I., G. Sukhorukov, et al. (2002). "A novel method for encapsulation of poorly water-soluble drugs: precipitation in polyelectrolyte multilayer shells." *Int J Pharm* 242(1-2): 219-23.
70. Ravi Kumar, M. N. (2000). "Nano and microparticles as controlled drug delivery devices." *J Pharm Pharm Sci* 3(2): 234-58.
71. Riggs, H. (1958). "For fluorescent labelling of proteins (e.g. immunofluorescence)." *Am. J. Pathol.*(34): 1081-1092.
72. Schlenoff, J. D., ST (2001). "Mechanism of Polyelektrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution." *Macromolecules*(34): 592-598.
73. Schneider, S., P. J. Feilen, et al. (2001). "Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets." *Biomaterials* 22(14): 1961-70.
74. Schneider, S., P. J. Feilen, et al. (2005). "Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice." *Diabetes* 54(3): 687-93.
75. Schuler, C. and F. Caruso (2001). "Decomposable hollow biopolymer-based capsules." *Biomacromolecules* 2(3): 921-6.
76. Seyrek, E., P. L. Dubin, et al. (2003). "Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions." *Biomacromolecules* 4(2): 273-82.
77. Shchukin, D. G., A. A. Patel, et al. (2004). "Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing." *J Am Chem Soc* 126(11): 3374-5.
78. Shchukin, D. G., G. B. Sukhorukov, et al. (2003). "Smart inorganic/organic nanocomposite hollow microcapsules." *Angew Chem Int Ed Engl* 42(37): 4472-5.
79. Shi, X. C., F (2000). "Release Behavior of Thin-Walled Microcapsules Composed of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* 17: 2036-2042.
80. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, G. (2005). "Product information sheet. Trypsin Type I from bovine Pancreas" [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).
81. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, G. (2005). "Product information sheet. Enzymatic Assay of Trypsin" [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).
82. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, G. (2005). "Product information sheet. Fluorescein Isothiocyanate" [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).
83. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, G. (2005). "Product information sheet. Total Protein Kit, Micro Lowry, Onishi & Barr Modification"

www.sigmaaldrich.com.

84. Sipos, T. and J. R. Merkel (1970). "An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin." *Biochemistry* 9(14): 2766-75.
85. Sukhorukov, G. B., E. Donath, et al. (2000). "Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes." *J Microencapsul* 17(2): 177-85.
86. Suzuki H, I. M., Kimura T, Iwanori Y, Ivamori M (2001). "Inhibitory activity of sulphoglycolipid derivatives towards pancreatic trypsin." *Glycoconjugate Journal* 17: 787-793.
87. Tiourina, O. P., Mohnwald, H et. al. (2001). "Entrapment of  $\alpha$ -Chymotrypsin into Hollow Polyelectrolyte Microcapsules." *Macromol. Biosci.* 1: 209-214.
88. Tiourina, O. P., I. Radtchenko, et al. (2002). "Artificial cell based on lipid hollow polyelectrolyte microcapsules: channel reconstruction and membrane potential measurement." *J Membr Biol* 190(1): 9-16.
89. Tiourina, O. P. and G. B. Sukhorukov (2002). "Multilayer alginate/protamine micro-sized capsules: encapsulation of  $\alpha$ -chymotrypsin and controlled release study." *Int J Pharm* 242(1-2): 155-61.
90. Trau, D. and R. Renneberg (2003). "Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications." *Biosens Bioelectron* 18(12): 1491-9.
91. Tresco, P. A., S. R. Winn, et al. (1992). "Polymer encapsulated neurotransmitter secreting cells. Potential treatment for Parkinson's disease." *Asaio J* 38(1): 17-23.
92. Volodkin, D. V., N. I. Larionova, et al. (2004). "Protein encapsulation via porous  $\text{CaCO}_3$  microparticles templating." *Biomacromolecules* 5(5): 1962-72.
93. Zeiss (2001). "LSM510 META Laser Scanning Microscopes Operating Manual, Rel. 3.0 Carl Zeiss GmbH."
94. Zhu, H. and M. J. McShane (2005). "Macromolecule encapsulation in diazoresin-based hollow polyelectrolyte microcapsules." *Langmuir* 21(1): 424-30.

## **9 Danksagung**

Ich danke meinen Eltern, Adelheid und Dipl.-Ing. Ulrich Garbers, für die Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und haben mir mit gutem Rat geholfen, meinen Weg zu finden. Vielen Dank auch für die wertvollen Korrekturen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, PD Dr. rer. nat. Hans Bäumler. In ihm habe ich einen Betreuer und Mentor gefunden, der mir mit viel Erfahrung und spritzigen Ideen zur Seite stand. Er hat sich viel Zeit genommen und war mir durch präzise Auseinandersetzung mit den Problemen während meiner Arbeit eine sehr große Hilfe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen lieben Kolleginnen und Kollegen im Labor der Forschungsabteilung des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité für die gute Zusammenarbeit bedanken. Frau Dipl.-Ing. Rita Mittlöhner gilt mein Dank für die Einführung in die Thematik sowie die Vorversuche und Recherchen zu diesem Thema. Frau Dr. rer. nat. Astrid Krabi danke ich für viele inspirierende Gespräche und für das Korrekturlesen. Frau Dipl.-Biol. Myriam Brähler danke ich die Unterstützung beim Umgang mit den Geräten und die schönen Tage im Labor.

## 10 Erklärung

„Ich, Eike Garbers, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Ployelektrolytbeschichtung von Mikrokapseln (PEMC)- Adsorption und Aktivität von Trypsin“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Eike Garbers, geboren am 01.04.1977 in Ulm

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1983 – 1987

Freie Waldorfschule Oldenburg

1990 – 1997

Herbartgymnasium Oldenburg

Abschluss: Abitur, Latinum

### Universität:

10 / 1999

Studium der Humanmedizin an der FU Berlin

08 / 2001

Ärztliche Vorprüfung (Physikum) Note „gut“

10 / 2001

Hochschulwechsel an die Humboldt Universität zu Berlin, Charité

08 / 2002

1. Abschnitt der Ärztlichen Staatsprüfung: Note „gut“

08 / 2004

2. Abschnitt der Ärztlichen Staatsprüfung: Note „gut“

10 / 2004 bis 09 / 2005

Praktisches Jahr

1. Tertial: Unfallchirurgie und Orthopädie,  
Charité, Berlin (CA Prof. Dr. N. Haas)

2. Tertial: Innere Medizin Schwerpunkt  
Rheumatologie Mt. Sinai Hospital, New York  
City, U.S.A.

3. Tertial: Orthopädische Chirurgie, Kantonsspital  
St. Gallen, Schweiz (CA Prof. Dr. M. Kuster)

12 / 2005

3. Abschnitt der Ärztlichen Staatsprüfung: Note „gut“

### Ärztliche Tätigkeit:

seit 12 / 2005

Assistenzarzt der Klinik für Orthopädische Chirurgie,  
Kantonsspital St. Gallen, Schweiz